



DEUTSCHES
PATENTAMT

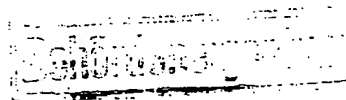
21 Aktenzeichen: P 33 27 447.9
22 Anmeldetag: 29. 7. 83
43 Offenlegungstag: 13. 6. 85

DE 3327447 A1

71 Anmelder:
Sanyo Machine Works Ltd., Aichi, JP

74 Vertreter:
Vossius, V., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Vossius, D.,
Dipl.-Chem.; Tauchner, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Heunemann, D., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Rauh, P.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 8000 München

72 Erfinder:
Kondo, Tatsuhei, Nagoya, Aichi, JP



Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

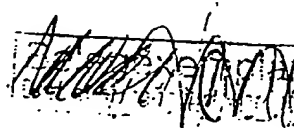
54 Carcinostatisches Mittel

Gegenstand der Erfindung ist ein carcinostatisches Mittel
mit immunverstärkender carcinostatischer Wirkung, das als
Wirkstoff Eisenin, ein Tripeptid der Sequenz

L-Pyroglu-L-Glu-L-Ala

enthält, in der Pyroglu, Glu und Ala Pyroglutaminsäure, Glu-
taminsäure bzw. Alanin bedeuten.

DE 3327447 A1



5 u.Z.: S 545 (Ra/kä)

Case: DTP 83 B 11

29. April 1983

SANYO MACHINE WORKS LTD
Nishikasugai, Japan

10

" Carcinostatisches Mittel "

15

P a t e n t a n s p r ü c h e

20

1. Carcinostatisches Mittel mit immunverstärkender carcino-
statischer Wirkung, g e k e n n z e i c h n e t durch
einen Gehalt an Eisenin, einem Tripeptid mit der Sequenz

L-Pyroglu-L-Glu-L-Ala

in der Pyroglu, Glu und Ala Pyroglutaminsäure, Glutamin-
säure bzw. Alanin bedeuten, und pharmazeutisch verträglichen
Träger-, Hilfs- und Zusatzstoffen.

25

2. Carcinostatisches Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekenn-
zeichnet, daß das Eisenin aus Eisenin bicyclis erhalten
wurde.

30

3. Carcinostatisches Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekenn-
zeichnet, daß das Eisenin auf synthetischem Weg erhalten
wurde.

35

4. Verwendung von Eisenin bei der Behandlung von Tumoren.

L

1
5 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein neues carcinostatisches Mittel mit immunverstärkender carcinostatischer Wirkung bereitzustellen. Diese Aufgabe wird durch die Erfindung gelöst.

10 Gegenstand der Erfindung ist ein carcinostatisches Mittel mit immunverstärkender carcinostatischer Wirkung, das als Wirkstoff Eisenin enthält. Dieses ist ein durch Extraktion aus dem Seetang Eisenia bicyclis oder auf synthetischem Weg
15 erhältliches Tripeptid. Die Erfindung betrifft somit ein carcinostatisches Mittel mit immunverstärkender carcinostatischer Wirkung, das als Wirkstoff Eisenin, ein Tripeptid mit der Sequenz

L-Pyroglu-L-Glu-L-Ala

20 enthält, in der Pyroglu, Glu und Ala Pyroglutaminsäure, Glutaminsäure bzw. Alanin bedeuten.

25 Eisenin ist ein Tripeptid, das aus dem Seetang Eisenia bicyclis extrahiert werden kann. In jüngster Zeit ist auch seine Synthese gelungen. Es hat die Form von farblosen langen Nadeln mit dem Glanz von Seidenfäden, zeigt positive Biuret-Reaktion, eine gewisse Schrumpfung beim Schmelzpunkt von 180°C und zersetzt sich beim Schmelzen bei 225 bis 226°C.

30 Seine wäßrige Lösung reagiert sauer.

35 Die Antitumorwirkung von Eisenin ist vermutlich keine direkte Wirkung, sondern sie zeigt sich derart, daß die nicht spezifische Abwehrkraft des lebenden Körpers verstärkt wird. Da

1 Eisenin eine einfache Tripeptid-Struktur hat, kann es leicht
synthetisiert werden. Ferner kann es, da es kristallin ist,
als feines Pulver erhalten werden und kann infolge seiner
Wasserlöslichkeit zu verschiedenen pharmazeutischen Zuberei-
5 tungsarten, wie Injektionspräparaten, Tabletten, Salben
und Suppositorien verarbeitet werden, wobei pharmakologisch
anwendbare Träger- und Hilfsstoffe benutzt werden, die übli-
cherweise in der pharmazeutischen Praxis eingesetzt werden.

10 In der beiliegenden Zeichnung zeigen:

Figur 1 in graphischer Darstellung die Antitumorwirkung
von Eisenin gegen einen isologen allogenen Tumor;

15 Figur 2 in graphischer Darstellung die lebensverlängernde
Wirkung von Eisenin beim Einsatz gemäß Fig. 1;

Figur 3 in graphischer Darstellung die Antitumorwirkung
ohne Beteiligung von T-Zellen;

20

Figur 4 in graphischer Darstellung die lebensverlängernde
Wirkung von Eisenin beim Einsatz gemäß Fig. 3; und

Figur 5 in graphischer Darstellung die Antitumorwirkung von
25 Eisenin gegen einen isologen xenogenen Tumor.

Eisenin, das durch Extraktion aus dem Seetang *Eisenia bicycli*
oder durch Synthese erhalten wurde, zeigte sich als wirksames
carcinostatisches Mittel mit immunverstärkender (immunopoten-
30 tierender) carcinostatischer Wirkung. Die Ergebnisse von Tier
versuchen, die im Hinblick auf die immunverstärkende carcino-
statische Wirkung von Eisenin durchgeführt wurden, sind nach-
stehend beschrieben. In den Figuren und Tabellen bedeuten die
Begriffe "mit Eisenin behandelt" bzw. "nicht behandelt", daß
35 Eisenin verabreicht bzw. nicht verabreicht wurde.

1 (1) Tierversuche

Als Versuchstiere werden Balb/C-Mäuse und nackte Mäuse verwendet. Die eingesetzten Tumoren sind Colon (Balb/C Colon-
5 Krebs) und Sarcoma 180.

- 10 a) 1 000 000 Zellen Colon 26 werden subcutan auf Balb/C-Mäuse transplantiert. Das Eisenin wird intraperitoneal den Mäusen jeden zweiten Tag dreimal in einer Menge von 5 mg/Tier gegeben. Das Gewicht der Tumoren und die Überlebensrate werden ermittelt. Die Ergebnisse sind in den Figuren 1 und 2 angegeben.
- 15 b) 1 000 000 Zellen Colon 26 werden subcutan nackten Mäusen eingesetzt. Eisenin wird intraperitoneal den Mäusen jeden zweiten Tag in einer Menge von 5 mg/kg gegeben. Das Gewicht der Tumoren und die Überlebensrate werden bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Figuren 3 und 4 angegeben.
- 20 c) 1 000 000 Zellen Sarcoma 180 werden subcutan Balb/C-Mäusen eingesetzt. Eisenin wird intraperitoneal und oral den Mäusen jeden zweiten Tag dreimal in einer Menge von 5 mg/Tier gegeben. Das Gewicht der Tumoren wird bestimmt. Die Ergebnisse sind in Figur 5 angegeben.
- 25 d) 10^6 rote Blutzellen vom Schaf (S R bc) werden, Balb/C-Mäusen intravenös injiziert. 4 Tage danach werden 10^8 rote Blutzellen vom Schaf und Phosphatpufferlösung (PBS) subcutan in die linke Fußsohle injiziert. Gleichzeitig wird Phosphatpufferlösung (PBS) allein subcutan in die rechte Fußsohle injiziert. 2 Tage später wird die Dicke beider Füße zur Prüfung auf verzögerte Hypersensitivität gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle I angegeben.
- 30
- 35

Tabelle I - Verzögerte Hypersensibilität

Gruppe 1 T (+). E (+)				Gruppe 2 T (+). E (-)				Gruppe 3 T (-). E (-)				Gruppe 4 T (-). E (+)			
L	R	L-R	$\frac{L-R}{R} \times 100$	L	R	L-R	$\frac{L-R}{R} \times 100$	L	R	L-R	$\frac{L-R}{R} \times 100$	L	R	L-R	$\frac{L-R}{R} \times 100$
1.59	1.57	0.02	1	1.91	1.69	0.22	13	1.90	1.85	0.05	3	2.09	1.86	0.23	12
1.56	1.54	0.02	1	1.83	1.83	0	0	1.95	1.85	0.10	5	2.18	1.98	0.20	10
1.87	1.68	0.19	11	1.91	1.80	0.11	6	2.08	1.92	0.16	8	1.84	1.86	0.02	0
1.95	1.49	0.46	31	1.86	1.67	0.19	11	1.89	1.78	0.11	6	1.93	1.81	0.12	7
1.75	1.67	0.08	5	1.78	1.69	0.09	5	1.91	1.82	0.09	5	1.87	1.72	0.15	9
1.54	1.57	0.03	0	1.96	1.72	0.24	14	2.01	1.78	0.23	13	1.93	1.61	0.32	20
1.58	1.54	0.04	3	1.71	1.52	0.19	13	1.97	1.91	0.06	3	1.87	1.88	0.01	0
1.90	1.65	0.25	15	1.82	1.69	0.13	8	1.99	1.80	0.19	11	1.93	1.87	0.06	3
-	-	-	-	1.83	1.87	0.04	0	1.92	1.82	0.10	5	-	-	-	-
-	-	-	-	1.77	1.77	0	0	1.92	1.75	0.17	10	-	-	-	-
Durchschnitt				Durchschnitt				Durchschnitt				Durchschnitt			
8				7				7				8			

Bemerkungen: 1. T(+) = Tumor transplantiert; T(-) = kein Tumor transplantiert.

2. E(+) = mit Eisenin behandelt; E(-) = nicht mit Eisenin behandelt.

3. L = Dicke der linken Pfote (mm);

R = Dicke der rechten Pfote (mm)

3327447

(2) In vitro Versuch

(a) Sensibilitätstest

Colon 26 wird gewebekultiviert und mit Eisenin in verschiedenen Konzentrationen 3 Tage in Berührung gebracht. Dem Medium wird Tritium-Thymidin, Uridin bzw. Leucin zugesetzt, und ihr Einbau in die Zellen wird untersucht, um den Hemmindex zu bestimmen. Die Ergebnisse der Prüfung des Einflusses von Eisenin auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese sind in Tabelle II angegeben.

Tabelle II

Sensibilitätstest

5	Eisenin- Konzentration (mg/ml)	1.0	0.1	0.01	0.001	0.0001	Vergleich
10	Zählungen pro min im Fall von Tritium- Thymidin (CPM)	140430	190120	207474	220010	231236	218622
		171170	203872	229569	213816	219336	220775
		163554	201151	240628	221170	224786	245962
		176167	223845	246273	213017	233612	226495
	Durchschnitt	170297	198381	238823	218332	229378	221964
	I.I. (%)	23	11	8	2	0	
15	Zählungen pro min im Fall von Uridin (CMP)	27088	32774	37043	39415	32836	32553
		20903	25271	33211	31675	29585	31801
		19954	24222	31498	28671	24135	30304
		22463	26786	34408	33161	29958	27653
	Durchschnitt	21107	25426	33039	31169	30793	31553
	I.I. (%)	33	19	0	0	2	
20	Zählungen pr min im Fall von Leucin (CPM)	6826	13311	12285	13620	12952	14674
		6150	12566	11020	14230	11936	11382
		—	8076	12097	13379	11808	12690
		6587	7076	11318	11355	10952	14350
	Durchschnitt	6521	11318	14478	13743	12232	13905
25	I.I. (%)	53	19	17	1	12	

Bemerkungen: (1) Der Hemmindex (I.I.) wird nach folgender Gleichung berechnet. Wenn der I.I. 75 % überschreitet, wird das Mittel als wirksam bewertet.

$$I.I. = \frac{CPM (Vergleich) - CPM (Arzneistoff)}{CPM (Vergleich)} \times 100$$

(2) Die Messung wird mit einem Scintillationszähler durchgeführt

(b) Cytotoxizitätstest

Balb/C-Mäusen wird intraperitoneal 15 mg Eisenin verabreicht. Einer Kontrollgruppe wird Stärke gegeben. Die verwendete Zielzelle ist BW 5174 (Thymoma der AKR-Maus). Milzzellen und intraperitoneale Zellen werden in anhaftende bzw. nicht anhaftende Zellen unterteilt und die Cytotoxizität wird in jedem Fall gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengefaßt.

Tabelle III

Cytotoxizitätstest

		Eisenin verabreicht	Vergleichs- gruppe
Milzzellen			
Gesamt		24%	23%
nicht anhaftende Zellen (Natürliche Killer)		13%	15%
anhaftende Zellen (Makrophagen)		10%	10%
Intraperitoneale Zellen			
Gesamt		24%	-8%
Nicht anhaftende Zellen (natürliche Killer)		32%	2%
anhaftende Zellen (Makrophagen)		17%	-5%

Bemerkungen: (1) Die prozentuale Cytotoxizität in Tabelle III beruht auf folgender Gleichung:

$$\text{Prozentuale Cytotoxizität} = \frac{\text{Testzählung} - \text{geringste Zählung}}{\text{Stärkste Zählung} - \text{geringste Zählung}} \times 100$$

(2) Die Messungen werden nach dem ^{51}Cr -Freisetungsversuch durchgeführt.

1 (c) Akute Toxizität

9 Balb/C-Mäusen mit einem durchschnittlichen Körpergewicht
von 20 g wird Eisenin intraperitoneal gemäß Tabelle IV ver-
5 abreicht.

Tabelle IV

Akute Toxizität

10

		Zahl der toten Tiere
Eisenin- Dosierung (g/kg)	6	7 / 9
	3	1 / 9

15

Bei der Zusammenfassung der Ergebnisse der vorstehend be-
schriebenen Versuche zeigt sich aus den Tabellen I und II im
20 Fall von isologen allogenen Tumoren, wie Colon 26 bei
Balb/C-Mäusen ein deutlicher Unterschied zwischen der mit
Eisenin behandelten und der nicht behandelten Gruppe. Eine
Antitumorwirkung von Eisenin ist deutlich zu erkennen. Die
Figuren 3 und 4 zeigen auch im Fall von nackten Mäusen ohne
25 T-Zellen, daß ähnliche Ergebnisse erhalten werden. Eine ähn-
liche Antitumorwirkung wird auch im Fall von isologen xeno-
genen Tumoren, wie Sarcoma 180 bei Balb/C-Mäusen festge-
stellt, wie in Figur 5 zu sehen ist. Andererseits kann aus
den Ergebnissen der Prüfung der verzögerten Hypersensibilität
30 bei Balb/C-Mäusen gemäß Tabelle I kaum ein Unterschied zwi-
schen den Durchschnittswerten der vier Gruppen von Kombina-
tionen aus Gegenwart und Abwesenheit von Tumortransplanta-
tion und Gegenwart und Abwesenheit einer Behandlung mit
Eisenin festgestellt werden. Eisenin hat also keine Wirkung

35

- 1 auf die Aktivierung einer immunologischen Reaktion, an der
T-Zellen teilnehmen. Aus den in Tabelle II enthaltenen Ergeb-
nissen der Sensibilitätsprüfung, bei der der Hemmindex in
allen Fällen niedrig ist, was auf fehlende Hemmwirkung durch
5 Eisenin hindeutet, kann erkannt werden, daß Eisenin keine
direkte Wirkung auf Tumorzellen hat.

Bei den Ergebnissen der in Tabelle III dargestellten Cyto-
toxizitätsprüfung zeigt sich zwar kein nennenswerter Unter-
10 schied im Fall von Milzzellen, jedoch ein deutlicher Unter-
schied im Fall der interperitonealen Zellen. Dies erlaubt
den Schluß, daß der durch Eisenin verursachte Immunitäts-
effekt hauptsächlich auf die Aktivierung der anhaftenden
Zellen und der nicht anhaftenden Zellen in der Peritoneal-
15 höhle zurückzuführen ist. Nach der Prüfung der akuten Toxi-
zität liegt der LD₅₀-Wert von Eisenin bei etwa 5 g/kg,
während die wirksame Dosis aufgrund der vorstehenden Prü-
fungen vermutlich bei etwa 15 mg pro 20 g liegt, bezogen
auf das durchschnittliche Körpergewicht der in den Versuchen
20 verwendeten Balb/C-Mäuse. Die Dosierung beträgt somit etwa
75 mg/kg und eine solche Dosis kann günstigerweise mehrmals
verabreicht werden.

25

30

35

Fig. 1

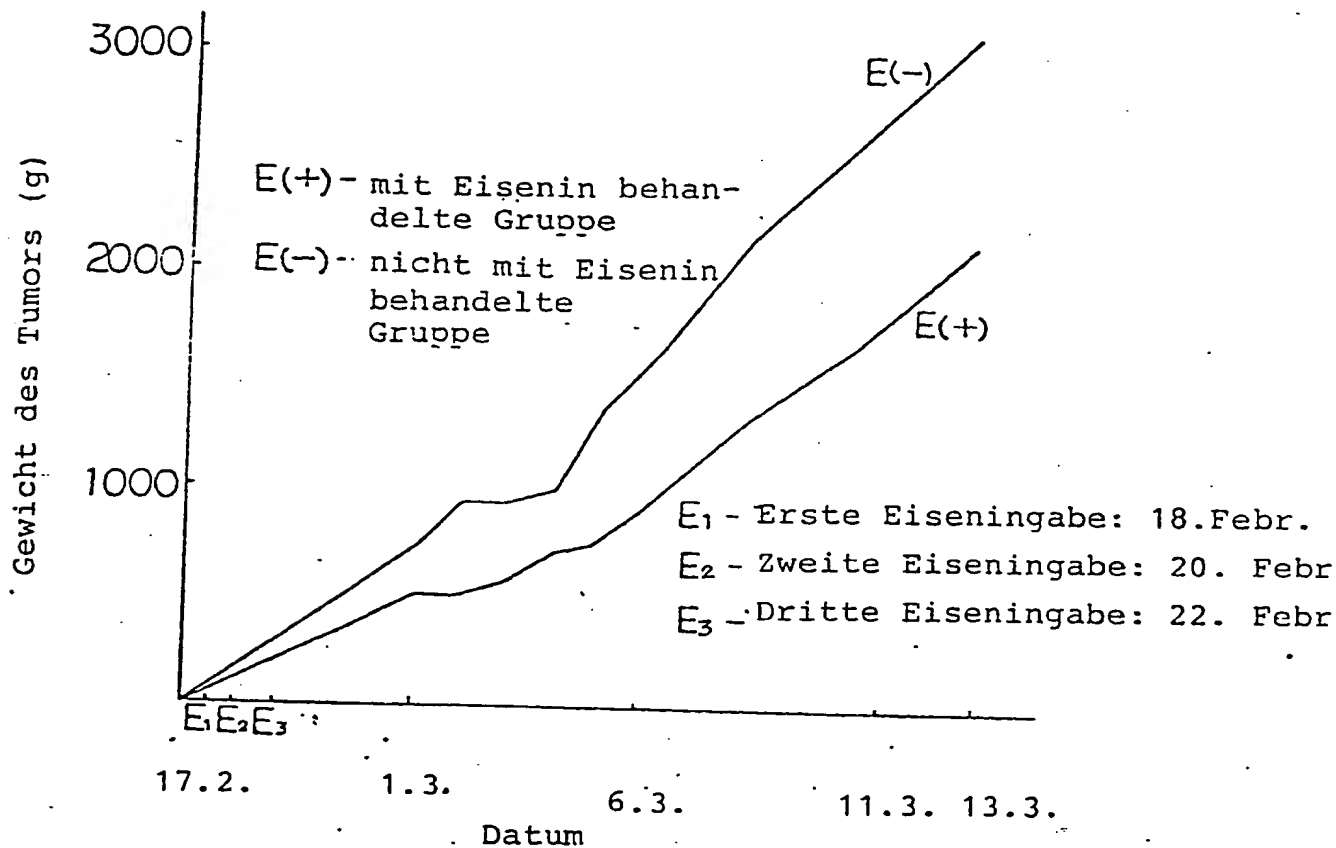


Fig. 2

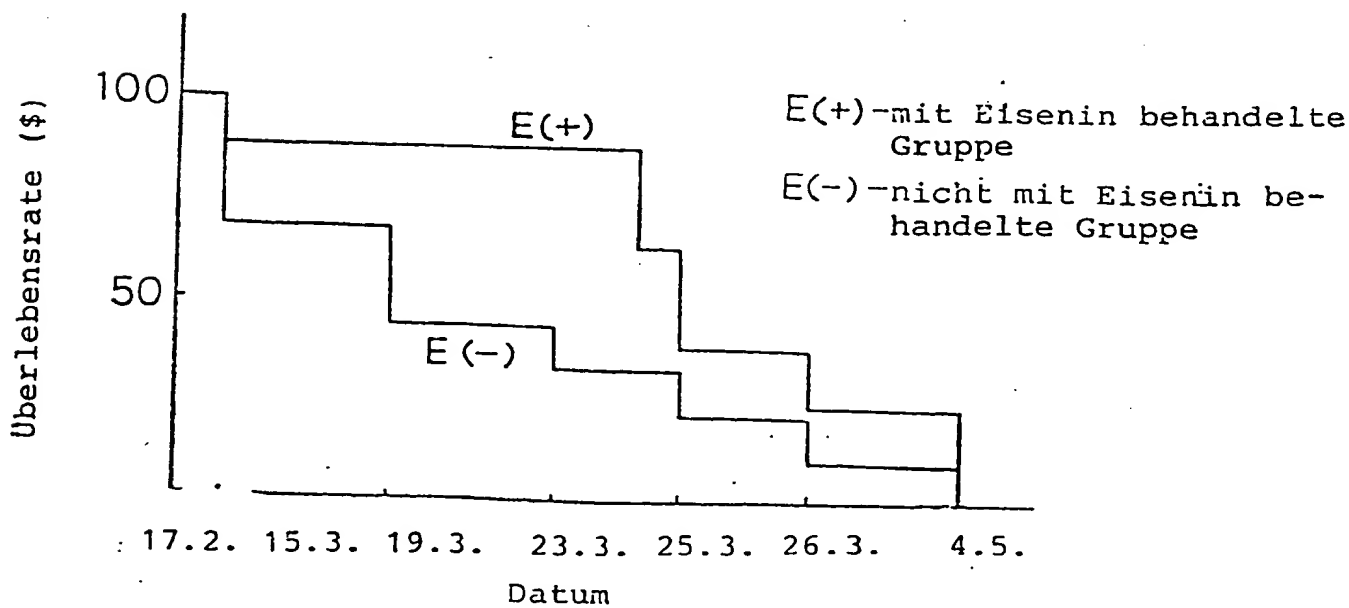


Fig. 3

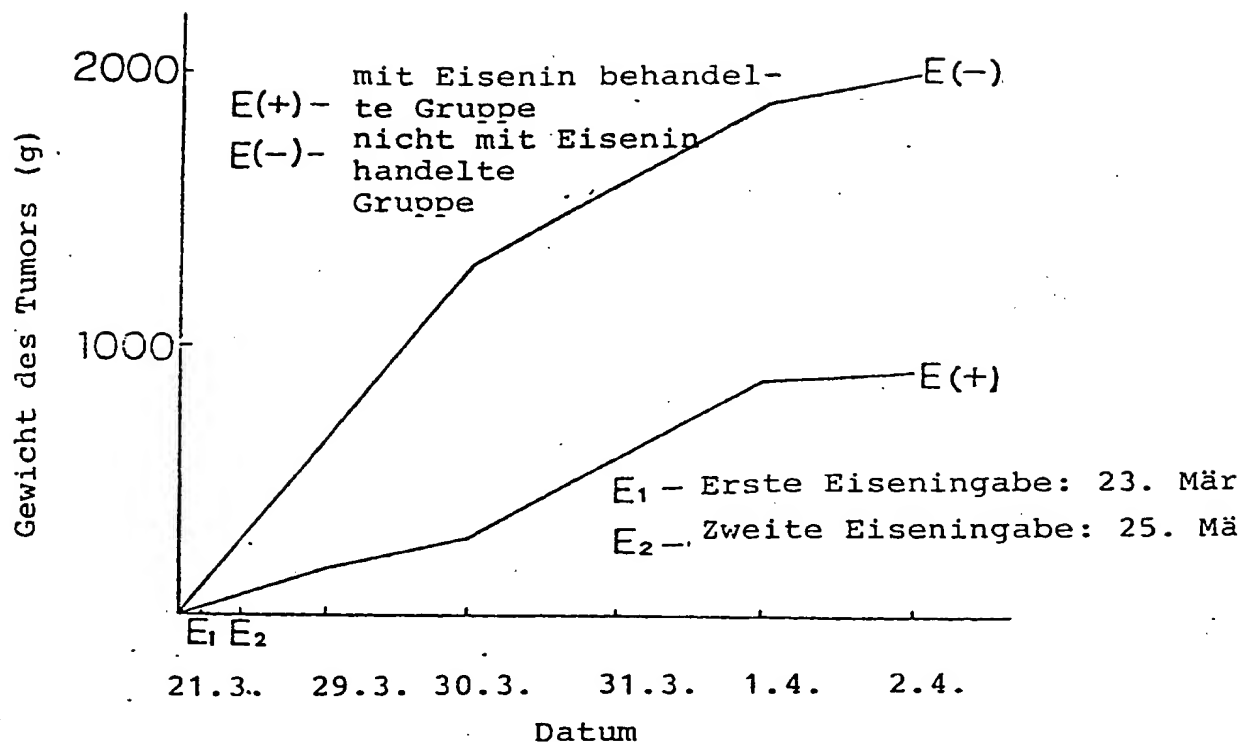
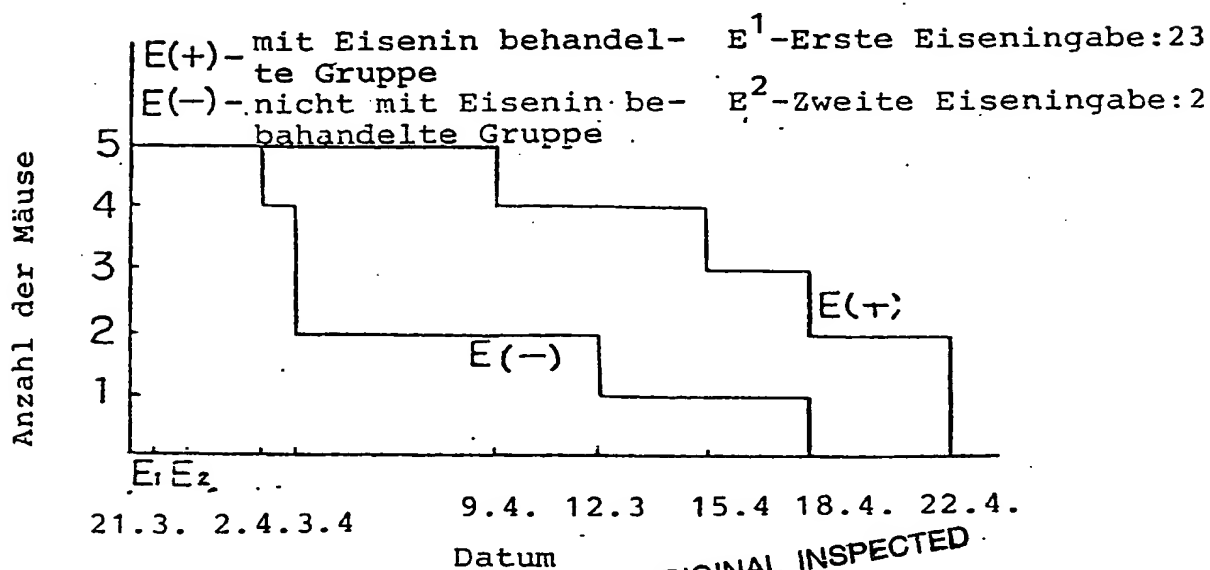


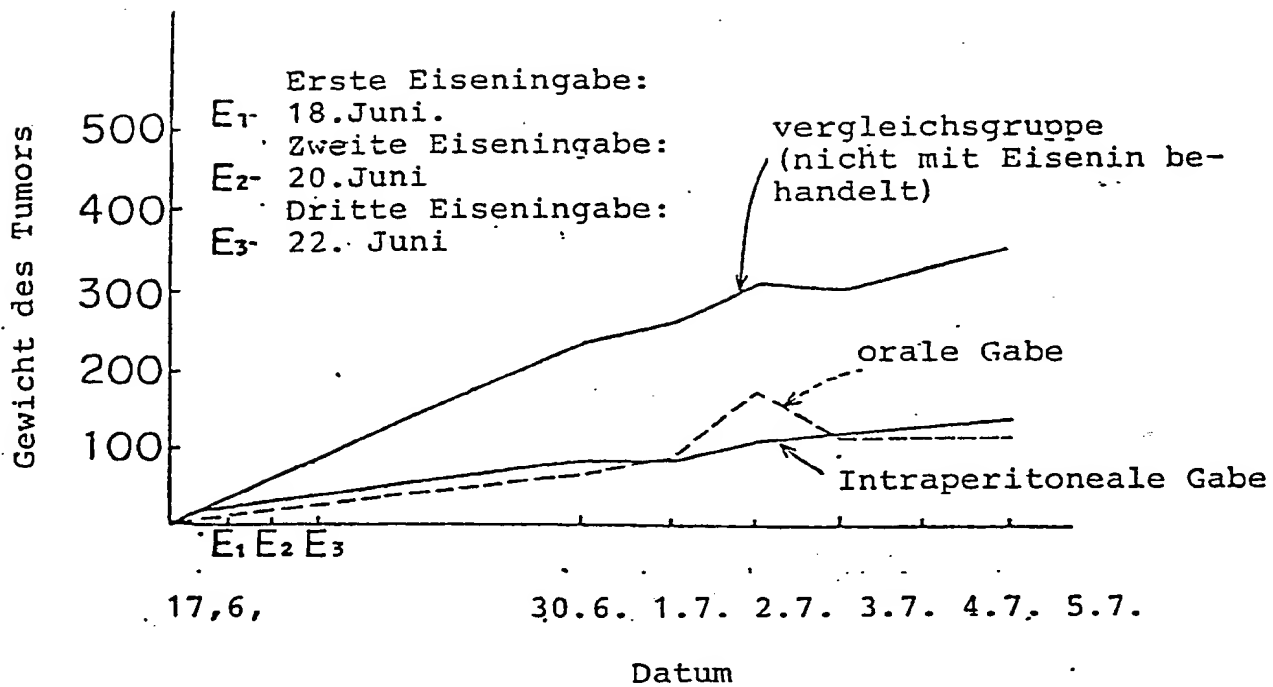
Fig. 4



ORIGINAL INSPECTED

INCOMPLETE DOCUMENT

Fig. 5



①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :

2 721 032

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

94 07083

⑤1 Int Cl⁶ : C 07 K 14/435, C 12 N 9/24, 5/10, A 61 K 38/17,
A 01 H 5/00, C 12 Q 1/68

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 09.06.94.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 15.12.95 Bulletin 95/50.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : INSTITUT PASTEUR — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Lee Won-Jae et Brey Paul T.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Harle et Phelip.

⑤4 Protéines liant le complexe lipopolysaccharidique (LPS), et leurs utilisations.

⑤7 Protéines liant le complexe lipopolysaccharidique des
bactéries et oligonucléotides codant pour ces protéines.
Ces protéines peuvent être utilisées dans le traitement
d'affections liées au complexe lipopolysaccharidique et en
particulier pour traiter le choc septique. Elles peuvent être
aussi mises en œuvre pour éliminer le complexe de prépa-
rations contenant ce dernier.

FR 2 721 032 - A1



La présente invention a pour objet une protéine liant le complexe lipopolysaccharidique (LPS).

Elle est en outre relative aux applications de cette protéine, en particulier dans une plante transgénique exprimant cette protéine.

Les attaques mécaniques, par exemple des insectes phytopathogènes, et les infections par les champignons, les bactéries et les virus induisent dans les tissus des plantes atteintes la synthèse de protéines appelées "Pathogenesis related protein" (protéines PR).

Les β -1,3 glucanases sont parmi les plus connues et les mieux étudiées de ces protéines PR. Cette observation et le fait que les β -1,3 glucanes constituent les composants majoritaires des parois des cellules fongiques ont conduit à émettre l'hypothèse d'une implication des β -1,3 glucanases dans les défenses moléculaires des plantes.

Plusieurs auteurs ont suggéré que de tels enzymes constituaient des facteurs de résistance aux maladies et agissaient en attaquant les parois cellulaires des champignons pathogènes induisant ainsi la lyse ou des effets inhibiteurs.

Si le mécanisme théorique de certaines β -1,3 glucanases a été étudié, aucune application pratique de ce type d'enzyme n'a jusqu'à présent été proposée.

Ainsi, à la connaissance du demandeur, aucune plante transgénique codant pour des β -1,3 glucanases exogènes n'a été décrite dans l'état de la technique.

On notera que si la présence de β -1,3 glucanase a été remarquée dans des plantes et des bactéries, aucune β -1,3-glucanase, ni β -1,3-1,4 glucanase, n'est à la connaissance du demandeur, synthétisée chez les animaux.

Chez l'homme et chez certains animaux, les infections par des bactéries gram-négatives peuvent provoquer de graves modifications pathologiques liées au choc septique. Par exemple, aux Etats-Unis le choc septique est responsable de 100.000 morts environ par an.

A la connaissance des demandeurs, aucun médicament efficace n'est actuellement disponible contre de telles affections.

Des protéines d'un arthropède marin (Xiphosma) appelé communément crabe des Moluques (Horseshoe crab en anglais) ont été proposées comme médicaments.

Les hémocytes de ces crustacés étaient connus pour agréger les endotoxines bactériennes.

AKETAGAWA et al. ont mis en évidence en 1986, (The Journal of Biological Chemistry, 261, n°16, 7357-7365), la structure d'une protéine de l'espèce japonaise (Tachypleus tridentatus) présentant une activité anti-lipopolysaccharidique. Le séquençage d'une protéine, présentant une identité de séquence de 83% avec la précédente, a été effectué à partir de l'espèce américaine (Limulus Polyphemus) par Muta et al. (J. Biochem. 101, 1321-1330, 1987).

Dans la demande internationale PCT/JP 88/00823, une protéine ayant une forte affinité pour le complexe lipopolysaccharidique est en outre décrite, ainsi que son utilisation pour éliminer les endotoxines bactériennes et comme agent thérapeutique contre les infections bactériennes.

Néanmoins, ces protéines présentent l'inconvénient notable d'être issues d'organismes très éloignés des mammifères et en particulier de l'homme.

Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles molécules permettant de prévenir et de combattre de manière efficace le choc septique dû aux infections, notamment par des bactéries gram-négatives.

Le complexe lipopolysaccharidique (LPS) des bactéries gram-négatives peut d'autre part constituer un contaminant de divers fluides tant biologiques que synthétiques, et en particulier des liquides injectables dans le corps humain.

Les molécules connues pour lier le complexe lipopolysaccharidique (LPS), appelées LPSBP (en anglais LPS

binding protein), et mentionnées ci-dessus pour leur effet thérapeutique ont déjà été proposées pour l'élimination du LPS de préparations où elles pourraient être présentes.

5 Néanmoins, il est nécessaire de trouver des molécules présentant une plus grande spécificité et une plus grande sensibilité pour leurs liaisons vis-à-vis du complexe lipopolysaccharidique.

10 Le demandeur s'est donc attaché à trouver un moyen permettant d'une part de combattre le choc septique chez les mammifères et en particulier chez l'homme et d'autre part de combattre les bactéries phytopathogènes.

Le demandeur a mis en évidence que le ver à soi de l'espèce Bombyx mori produit une protéine répondant à ces deux exigences.

15 Il a ainsi mis en évidence que cette protéine permet de combattre le choc septique induit par la présence de complexe lipopolysaccharidique (LPS) et d'autre part d'éliminer ce complexe des préparations destinées à être injectées en particulier à l'homme.

20 Il a aussi montré que l'intégration dans le génome de plantes d'un gène codant pour cette protéine permet de combattre les infections fongiques phytopathogènes.

25 La présente invention a pour objet une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend en totalité ou en partie la séquence SEQ ID N°1 suivante:

Arg Ile Ser Val Gln Asp Val Pro Lys Met Thr Leu Phe Ala Phe
Gln Gly Asn Leu.

30 Elle est en outre relative à une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend en partie ou en totalité la séquence SEQ ID N°2 suivante:

Phe His Thr Tyr Ser Val Gln Trp Thr Pro Asp Phe Ile Ala Leu
Ser Val Asp Gly.

35 De telles protéines présentent avantageusement un poids moléculaire de l'ordre de 50 kD. Elles comprennent préférentiellement la séquence SEQ ID N°3 ou une partie de la

séquence SEQ ID N°3 suivante:

Lys Ile Ser Tyr Ala Gln Met Pro Asp Val Lys Ile Gln Ala Phe
 Arg Pro Lys Gly Leu Arg Ile Ser Val Gln Asp Val Pro Lys Met
 Thr Leu Phe Ala Phe Gln Gly Asn Leu Asn His Lys Leu Asp S r
 5 Thr Ser Val Gly Thr Leu Ser Ala Glu Val Leu Asp Pro Val Asn
 Gly Arg Trp Val Tyr Glu Glu Pro Asp Leu Lys Leu Lys Val Lys
 Asp Val Val Tyr Tyr Asn Ala Val Phe Ser Ile Asn Lys Lys Ile
 Tyr Glu Lys Thr Asn Gln Gln Phe Thr Val Thr Glu Leu Glu Asp
 Pro Asn Ala Ser Thr Asp Ser Gln Lys Pro Glu Cys Lys Pro Thr
 10 Lys Thr Arg Val Arg Gly Gly Lys Ala Cys Ala Gly Gln Thr Ile
 Phe Glu Glu Gln Phe Asp Ser Leu Asp Glu Asn Val Trp Gln Ile
 Glu Gln Tyr Ile Pro Ile Tyr His Pro Glu Tyr Pro Phe Val Ser
 Tyr Gln Arg Asn Asn Leu Thr Val Ser Thr Ala Asp Gly Asn Leu
 His Ile Asn Ala Lys Leu Gln Gln His Met Pro Gly Phe Leu Asp
 15 Asp Ser Ile Tyr Ser Gly Thr Leu Asn Leu Phe Ser Gly Cys Thr
 Ser Ser Ala Glu Ala Cys Ile Lys Gln Ala Ser Gly Ala Asp Ile
 Leu Pro Pro Ile Val Ser Gly Arg Ile Thr Ser Ile Gly Phe Ala
 Phe Thr Tyr Gly Thr Val Glu Ile Arg Ala Lys Leu Pro Gln Gly
 Asp Trp Leu Tyr Pro Glu Ile Leu Leu Glu Pro Phe Leu Lys Lys
 20 Tyr Gly Ser Met Asn Tyr Ala Ser Gly Val Val Lys Ile Ala Cys
 Ala Arg Gly Asn Ala Glu Leu Tyr Ser Gly Pro Asn Asp Tyr Ser
 Asn Thr Val Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Met Asp Leu Glu Cys Arg
 Glu Asn Phe Leu Ser Thr Lys Arg Arg Arg Asp Gly Thr Ser Trp
 Gly Asp Ser Phe His Thr Tyr Ser Val Gln Trp Thr Pro Asp Ph
 25 Ile Ala Leu Ser Val Asp Gly Glu Glu Trp Ala Arg Val Glu Ala
 Pro Arg Asp Ala Leu Pro Ala Val Cys Ala His Ala Pro Arg His
 Leu Leu Gln Ala Gly Ser Gln Met Ala Pro Phe Asp Asp His Phe
 Tyr Ile Thr Leu Gly Val Ala Ala Gly Gly Ile Thr Glu Phe Arg
 Asp Gly Ser Ile Thr Ser Gly Gly Val Thr Lys Pro Trp Arg Asp
 30 Ser Ala Arg Lys Ala Ser Val His Phe Trp Arg His Met Ser Asp
 Trp Phe Pro Arg Trp Ser Gln Pro Ser Leu Ile Val Asp Phe Val
 Lys Val Ile Ala Leu

Les dites protéines peuvent aussi présenter la séquence
 ID N°5 ou une partie de la SEQ ID N°5 suivante:

35 Met Gly Gly Arg Val Leu Cys Leu Ile Leu Phe Ile Lys Ile Ser

Tyr Ala Gln Met Pro Asp Val Lys Ile Gln Ala Phe Arg Pro Lys
 Gly Leu Arg Il Ser Val Gln Asp Val Pro Lys Met Thr Leu Phe
 Ala Phe Gln Gly Asn Leu Asn His Lys Leu Asp Ser Thr Ser Val
 Gly Thr Leu Ser Ala Glu Val Leu Asp Pro Val Asn Gly Arg Trp
 5 Val Tyr Glu Glu Pro Asp Leu Lys Leu Lys Val Lys Asp Val Val
 Tyr Tyr Asn Ala Val Phe Ser Ile Asn Lys Lys Ile Tyr Glu Lys
 Thr Asn Gln Gln Phe Thr Val Thr Glu Leu Glu Asp Pro Asn Ala
 Ser Thr Asp Ser Gln Lys Pro Glu Cys Lys Pro Thr Lys Thr Arg
 Val Arg Gly Gly Lys Ala Cys Ala Gly Gln Thr Ile Phe Glu Glu
 10 Gln Phe Asp Ser Leu Asp Glu Asn Val Trp Gln Ile Glu Gln Tyr
 Ile Pro Ile Tyr His Pro Glu Tyr Pro Phe Val Ser Tyr Gln Arg
 Asn Asn Leu Thr Val Ser Thr Ala Asp Gly Asn Leu His Ile Asn
 Ala Lys Leu Gln Gln His Met Pro Gly Phe Leu Asp Asp Ser Ile
 Tyr Ser Gly Thr Leu Asn Leu Phe Ser Gly Cys Thr Ser Ser Ala
 15 Glu Ala Cys Ile Lys Gln Ala Ser Gly Ala Asp Ile Leu Pro Pro
 Ile Val Ser Gly Arg Ile Thr Ser Ile Gly Phe Ala Phe Thr Tyr
 Gly Thr Val Glu Ile Arg Ala Lys Leu Pro Gln Gly Asp Trp Leu
 Tyr Pro Glu Ile Leu Leu Glu Pro Phe Leu Lys Lys Tyr Gly Ser
 Met Asn Tyr Ala Ser Gly Val Val Lys Ile Ala Cys Ala Arg Gly
 20 Asn Ala Glu Leu Tyr Ser Gly Pro Asn Asp Tyr Ser Asn Thr Val
 Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Met Asp Leu Glu Cys Arg Glu Asn Ph
 Leu Ser Thr Lys Arg Arg Arg Asp Gly Thr Ser Trp Gly Asp S r
 Phe His Thr Tyr Ser Val Gln Trp Thr Pro Asp Phe Ile Ala Leu
 Ser Val Asp Gly Glu Glu Trp Ala Arg Val Glu Ala Pro Arg Asp
 25 Ala Leu Pro Ala Val Cys Ala His Ala Pro Arg His Leu Leu Gln
 Ala Gly Ser Gln Met Ala Pro Phe Asp Asp His Phe Tyr Ile Thr
 Leu Gly Val Ala Ala Gly Gly Ile Thr Glu Phe Arg Asp Gly Ser
 Ile Thr Ser Gly Gly Val Thr Lys Pro Trp Arg Asp Ser Ala Arg
 Lys Ala Ser Val His Phe Trp Arg His Met Ser Asp Trp Phe Pro
 30 Arg Trp Ser Gln Pro Ser Leu Ile Val Asp Phe Val Lys Val Ile
 Ala Leu

Cette dernière protéine présente avantageusement une
 glycosylation, en particulier en position 182 de sa séquence
 d'acides aminés.

35 On notera que la présente invention concerne non

seulement les protéines dont la séquence est indiquée ci-dessus mais aussi leurs fragments ainsi que tous les variants de ces protéines qui consisteraient en des modifications dans la structure ne modifiant pas la fonction de ces protéines, que ce soit en particulier une fonction de protection des plantes contre les phytopathogènes, de traitement de choc septique ou de liaison du LPS.

Notamment, de tels variants peuvent consister en des substitutions d'un acide aminé par un autre acide aminé présentant une formule différente mais une fonction sensiblement identique.

L'ouvrage de Lehninger (Biochimie, Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires, seconde édition 1979, Flammarion Médecine Science Ed.) précise que les vingt acides aminés les plus fréquemment rencontrés peuvent être subdivisés en quatre groupes, en fonction de leurs structures chimiques. On notera que selon la présente invention, la substitution d'un acide aminé d'une des protéines décrites ci-dessus par un autre acide aminé appartenant au même groupe n'introduit pas un changement fonctionnel dans la structure de la protéine, et que les protéines dans lesquelles il existe une simple substitution de ce type, appelée aussi substitution conservative, rentrent dans le cadre de la présente invention.

Ceci n'implique pas pour autant que des substitutions d'un acide aminé d'un groupe donné par un autre acide aminé appartenant à un autre groupe aient pour effet d'écarter de telles protéines modifiées du cadre de la présente invention. En effet, la présente invention concerne toute molécule présentant une structure similaire et dont la fonction telle que définie ci-dessus est conservée.

La présente invention est en outre relative à des oligonucléotides, et en particulier des molécules d'ADN codant au moins pour l'une des protéines ou l'un de ses fragments décrits ci-dessus, et est relative en particulier à la molécule d'ADN comprenant la séquence SEQ ID N°4 suivante:

GAGGATCCGG GTACC ATG GGT GGA CGC GTG TTG TGT CTG ATT TTA TTT
ATA AAA ATA TCG TAC GCT CAA ATG CCC GAT GTG AAA ATA CAA GCT
TTT CGC CCG AAA GGA CTT CGA ATA TCC GTT CAA GAT GTC CCC AAA
ATG ACA CTG TTC GCG TTC CAA GGC AAC TTG AAC CAT AAA CTG GAC
5 AGC ACC AGC GTC GGG ACA CTG AGT GCA GAG GTA CTG GAT CCA GTC
AAC GGC CGA TGG GTG TAC GAA GAG CCC GAT CTT AAA CTA AAA GTC
AAG GAC GTC GTC TAT TAT AAC GCG GTC TTC TCA ATC AAC AAG AAA
ATA TAC GAG AAA ACA AAC CAA CAG TTC ACC GTA ACA GAG CTA GAA
GAT CCT AAT GCA AGC ACA GAT TCT CAG AAA CCA GAA TGT AAG CCA
10 ACA AAG ACG AGA GTG CGA GGC GGC AAA GCG TGT GCC GGA CAA ACA
ATA TTC GAG GAG CAA TTT GAT TCC CTG GAC GAA AAC GTT TGG CAA
ATC GAG CAG TAT ATA CCG ATT TAT CAC CCC GAA TAC CCC TTC GTG
TCC TAC CAG CGT AAT AAT TTA ACA GTA TCT ACC GCA GAT GGA AAC
CTA CAT ATT AAC GCC AAA CTT CAA CAA CAT ATG CCC GGC TTT CTG
15 GAC GAC TCT ATA TAT TCT GGC ACA CTT AAT TTG TTC AGT GGG TGT
ACT TCG TCA GCA GAG GCA TGC ATC AAA CAG GCT TCC GGT GCT GAT
ATT CTA CCA CCA ATC GTC AGC GGC AGA ATC ACA TCA ATA GGA TTT
GCA TTT ACG TAC GGA ACA GTC GAA ATC AGA GCG AAA TTA CCG CAA
GGG GAC TGG CTG TAT CCG GAA ATT CTA TTG GAG CCG TTC TTA AAG
20 AAG TAT GGA AGT ATG AAT TAT GCG TCC GGC GTA GTG AAG ATA GCG
TGT GCG CGC GGT AAT GCA GAA CTC TAT TCC GGA CCT AAT GAC TAC
AGC AAT ACG GTT TTG TAC GGA GGA CCG ATC ATG GAT CTG GAG TGC
CGC GAG AAC TTT CTC TCC ACA AAA AGA CGC AGA GAC GGC ACG TCG
TGG GGC GAC AGT TTT CAT ACA TAT TCC GTT CAA TGG ACA CCT GAT
25 TTC ATA GCC CTG TCT GTG GAC GGC GAG GAG TGG GCG CGA GTG GAG
GCG CCG CGG GAC GCC CTG CCG GCT GTC TGC GCG CAC GCC CCG CGG
CAC CTG CTG CAG GCC GGC TCG CAG ATG GCG CCA TTC GAT GAC CAC
TTC TAC ATA ACG CTA GGC GTG GCG GCA GGA GGC ATA ACG GAG TTC
CGC GAC GGG TCT ATA ACC TCC GGG GGA GTC ACC AAG CCC TGG AGA
30 GAC AGC GCT CGG AAG GCA TCC GTA CAT TTC TGG CGG CAC ATG TCC
GAT TGG TTC CCA CGG TGG AGT CAG CCA TCT TTA ATC GTG GAC TTT
GTC AAA GTT ATC GCC TTA TGATCTAGTC ATTTAGATTT TGTATAATTA
AGTTATTAGT ATAGTTTCTG CAGGCAAAAT TAATTGCATT CTGAGTTTTT
ATTGTCAAAC TACAATTTAA AATTTAATTC CTAAAAGATC TCTCTTCTTT
35 CTAAATCTGT AATTTAGCTA ATTTTATTTG TATCATTTTC TTTTTTTAAA

TTTTGATAGA GCGGCGAATG ACTAGAAGAT GTGATCTGCG AAAATAAAAC
 TAAGTGACAT GCATGCAAAG GCATACACAC AACAGAGTTT TGCATTATTA
 TTACCTTTCT TGAGCGAGAT GAGGACTACT GACGTGACCT GGAGTGATAT
 TTTGGAGCAA GCCTAAGACA GGGTCAAGTG GAGACAGCTC TAAGGCCCCCT
 5 ATGTACCGGC GGGGTGTCTT AGGGCTGCAA TAACAACATT ACCTTTCTTA
 ACCAAACAGC GATATTATCT GTAATATTAT AGTTAGAAAG CCTGCATCTT
 ATACTCTTAT TGACACACGT ACCTGGATGA TTTTAACGAT GAAGAAATAA
 CATCGTGTA AAAATTTAGC TGGAAAAGAT TTTGAGGAAT CAAGAAATAC
 CCTATGAACC AGCACAGGTA CGTGTCACCA CTCTGGCTAA TTCTGCCACG
 10 TTGCGGTTGG TTTGAAGTTT GAGACAACCT TTGCACGATA CAATTGAGAC
 TAAGACCTCA TGGCTCGGAG TGAGTGGAGT CATTCAAGTT GCGACTGGCT
 CCAGTAACCA CTTATAACCA GGTAGATCGT GAGCCTATCA GCTCATTTAG
 AGCAACAAAA AACAAAATAA TGTACTCTTG AAAAAATCAT TTTAATAAAA
 GACCAGAGTG AAAAAAAAAA AAAAA

15 La présente invention a de plus pour objet des cellules eucaryotes ou procaryotes exprimant une des protéines décrites ci-dessus ou un de leurs fragments, ou portant au moins une partie d'un oligonucléotide mentionné ci-dessus.

20 L'une des cellules est avantageusement une cellule bactérienne ou une cellule végétale, par exemple issue d'une plante appartenant à la famille de la vigne, du tabac, de la tomate ou de la pomme de terre.

25 Un autre objet de la présente invention est un procédé d'obtention d'une des protéines décrites ci-dessus ou d'un d leurs fragments, caractérisé en ce qu'un oligonucléotide, tel qu'un de ceux mentionnés ci-dessus, est exprimé dans un cellule procaryote ou eucaryote adaptée.

30 Les protéines, objets de la présente invention peuvent néanmoins être obtenues par toute autre méthode à la disposition de l'homme du métier, telle que la synthèse chimique, et en particulier celles répertoriées dans le manuel général: "Molecular cloning: A Laboratory manual" (Sambrook et al, 1989, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY, 2ème édition) et dans ses rééditions récentes.

35 De manière général, l'homme du métier se référera

aussi à ce manuel pour la mise en oeuvre de la présente invention.

5 Outre les objets mentionnés ci-dessus, la présente invention est relative à un médicament contenant une des protéines décrites ci-dessus ou un de leurs fragments et l'utilisation d'une telle protéine pour la fabrication d'un médicament pour le traitement des affections liées au complexe lipopolysaccharidique, et en particulier pour traiter le choc septique.

10 On notera que la distance génétique entre les mammifères et le ver à soie est plus faible que celle entre les mammifères et les Xiphosma. Les protéines objets de la présente invention, qui sont dérivées d'une protéine du ver à soie seront donc mieux acceptées par les mammifères, et en
15 particulier l'homme, que les protéines extraites de Limulus, ou, d'espèces voisines, dont l'utilisation est proposée dans PCT/JP88/00823.

L'administration des protéines selon l'invention pourra se faire par toute méthode appropriée, préférentiellement par
20 injection afin de combattre rapidement les effets du choc septique.

Un autre objet de la présente invention est un procédé d'élimination du complexe lipopolysaccharidique de préparations contenant ce dernier, ledit procédé consistant à
25 lier ledit complexe à une des protéines décrites ci-dessus ou à un de leurs fragments.

Un tel procédé peut notamment être mis en oeuvre en fixant sur un support la protéine liant ledit complexe.

30 La présente invention a encore pour objet une plante portant au moins un gène codant pour une protéine exogène ayant une activité β -1,3 glucanase.

Une telle protéine est avantageusement une des protéines définies ci-dessus ou un de ses fragments. Le gène porté par la plante peut quant à lui comprendre au moins une
35 partie d'un ADN défini ci-dessus.

Une telle plante appartient de manière préférentielle à la famille de la vigne, du tabac, de la tomate ou de la pomme de terre.

5 Enfin, la présente invention est relative à l'utilisation de fragments des oligonucléotides décrits ci-dessus pour l'amplification génique. Une telle amplification peut être mise en oeuvre selon la méthode décrite dans la demande FR-92.13.562.

10 La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par les exemples qui suivent et en référence aux dessins annexés dans lesquels:

La figure 1A représente un gel SDS-PAGE d'extraits de bactéries gram-négatives. Le puits 1 correspond à un mélange de marqueurs protéiques (phosphorylase b, 92 kD; sérum albumine bovine 66,2 kD; ovalbumine 43 kD; anhydrase carbonique 30 kD). Le puits 2 est un témoin du test de liaison effectué sans hémolymphe (bactéries seules). Le puits 3 est un test de liaison effectué avec de l'hémolymphe immune (immunisation par injection de *E. cloacae*). Le puits 4 correspond à un test de liaison effectué avec de l'hémolymphe immune, l'immunisation ayant été effectuée par abrasion procuticulaire et application topique de *E. cloacae*.

25 La figure 1B est une cartographie peptidique effectuée en CHLP à la suite de la digestion in situ de la protéine P-50 par l'endopeptidase Lys-C. Les pics peptidiques indiqués par les flèches noires et blanches ont été soumis à une analyse de leur séquence en acides aminés.

La figure 2 illustre un test de liaison effectué en utilisant de l'hémolymphe non-immune (puits 3) ou de l'hémolymphe immune (puits 1, 2, 4, 5 et 6). Les temps d'incubation du test de liaison sont d'une minute (puits 1); de 2,5 minutes (puits 2 et 3), de 5 minutes (puits 4), de 15 minutes (puits 5), et de 30 minutes (puits 6). Le puits 7 correspond à des marqueurs de poids moléculaire dont les tailles sont indiquées en kD.

La figure 3A illustre la position des deux paires d'amorces dégénérées (P1 et P3 pour le brin sens et P2 et P4 pour le brin anti-sens).

5 La figure 3B représente l'analyse des produits MOPAC sur un gel d'agarose à 2%. Le puits 1 correspond à un aliquote de 10 μ l du produit MOPAC obtenu en utilisant P1 et P4. Le puits 2 correspond à un aliquote de 10 μ l du produit MOPAC obtenu en utilisant P3 et P2. Le puits 3 correspond au marqueur de poids moléculaire (100 pb Ladder Pharmacia). La
10 flèche indique la position du produit de 160 paires de base.

La figure 4 représente une carte de restriction utilisée pour l'analyse du cDNA P-50 lambdaBP5001. La région de la protéine codante est indiquée en blanc.

15 La figure 5 illustre l'analyse de l'hydropathie de la protéine P-50. Les numéros des résidus aminoacides sont indiqués sur la ligne horizontale tandis que l'hydrophobie et l'hydrophilie sont indiquées respectivement au-dessus et en-dessous de la ligne horizontale.

20 La figure 6 illustre les similarités et les identités de séquences entre la P-50 et diverses glucanases.

La signification des abréviations est comme suit : Bci: β -1,3 glucanase de *Bacillus circulans* , Fsu: β -1,3-1,4 glucanase de *Fibrobacter succinogenes* ; Cth: β -1,3-1,4 glucanase de *Clostridium thermocellum* ; Bsu : β -1,3-1,4
25 glucanase de *Bacillus subtilis* ; Bam: β -1,3-1,4 glucanase d *Bacillus amyloliquefaciens* ; Bma: β -1,3-1,4 glucanas d *Bacillus macerans* ; Bli: β -1,3-1,4 glucanase de *Bacillus licheniformis* .

30 La figure 7 illustre les similarités et les identités de séquences entre P-50 et les domaines de liaison du LPS d s protéines LBP et BPI humaines, telles que décrites par SCHUMANN et al. (1990, Science, 249, 1429) et HOESS et al. (1993, EMBO J., 12, N°9, 3351-3356).

35 Dans ces deux dernières figures les similarités et les identités entre les acides aminés sont indiquées par des

cadres. Les acides aminés identiques sont quant à eux indiqués par des points. Les nombres indiqués sur la gauche se réfèrent à la position du résidu dans chaque protéine.

5 La figure 8 est une photographie d'un gel SDS-PAGE fluorographié de produits de traduction d'ARN messagers codant pour la protéine P-50 (puits 1). Le puits 2 correspond à un témoin sans ARN messagers. Les poids moléculaires de référence sont indiqués sur la droite de la figure.

10 La figure 9A est un autoradiogramme d'un transfert d'ARN messagers hybridés avec le fragment Pst I/EcoRI de lambdaBP5001 (1,2 kb).

15 Les puits 1,3 et 5 correspondent à l'ARN total extrait de corps gras de larves et les puits 2,4 et 6 correspondent à l'ARN total extrait de cellules épidermiques, avant abrasion procuticulaire (puits 1 et 2) et six heures après l'abrasion en présence de bactéries (puits 3 et 4) ou six heures après l'abrasion sans bactéries (puits 5 et 6).

La taille de marqueur de poids moléculaire est indiquée sur la gauche de l'autoradiogramme.

20 La figure 9B représente le même transfert déshybridé puis réhybridé avec une sonde correspondant à l'ADN complémentaire de l' α -tubuline (flèche blanche) et avec une sonde correspondant au gène de la cécropine B2 (flèche noir).

EXEMPLE 1:

25 Détermination de la séquence de la protéine P-50

A) MATERIELS ET METHODES

1. Réactifs chimiques et instruments

30 Les réactifs ont été fournis par Bio-Rad Labs (Richmond, CA) pour l'acrylamide, la N,N'-méthylènebisacrylamide, le persulfate d'ammonium, le N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine, le Tris, la glycine et le Bleu de Bromophénol, par Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Tokyo, Japon) pour le 2-mercaptoéthanol, par Scharz/Mann Biotech (Cleveland, OH) pour la tricine, par Fluka Biochemika
35 (Buchs, Allemagne), pour le sulfate de dodécyle sodique, par

Perkin-Elmer Cetus pour la polymérase de *Thermus aquaticus*, par Sigma (St, Louis MO) pour Ponceau S, par Boehringer pour l'endopeptidase Lys-C, par Amersham pour le système ECL, par BRL pour la transcriptase inverse du MuLV, par Stratagène pour la trousse de clonage par PCR, par Amersham pour le système de marquage de l'ADN Mega Prime, par Stratagène pour le kit de transcription des ARN, par Pharmacia pour le kit de séquençage T7, par Promega pour la trousse de séquençage Taq Track, par Pharmacia-LKB (Uppsala, Suède) pour le mélange de marqueurs de poids moléculaire, et par Applied Biosystems (Foster City, CA), pour la membrane à haute capacité Milli-ProBlott PVDF.

Tous les autres produits chimiques sont des produits commerciaux de grande qualité.

2. Organismes, cellules, immunisation et récupération de l'hémolymph

Les vers à soie *Bombyx mori* (Asahi x Tokai) ont été fournis par Toyo Sangyo Consulting, Inc., Tokyo, Japon.

Ils ont été cultivés sur un milieu artificiel (poudre de mûrier) à 23°C avec une photopériode de 14 heures.

Des larves au cinquième stade de la mue sont cultivées jusqu'au 5ème jour de ce stade et immunisées par injection d 10 µl d'*Enterobacter cloacae* (souche 57-9, Collection de l'Institut Pasteur) en fin de phase de croissance logarithmique. Les larves sont alors conservées 24 heures en présence de nourriture puis l'hémolymph est récupérée.

L'immunisation par abrasion cuticulaire et application de bactéries est effectuée comme décrite par Brey et al. (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90. 6275-6279).

Pour certaines expérimentations, les vers à soie sont aussi cultivés dans des conditions axéniques (Brey et al., 1993, précédemment cités).

L'hémolymph est récupérée en effectuant une incision du corps des larves dans des tubes contenant quelques cristaux de phénylthiourée puis est centrifugée à 4000 g durant 10 minutes à 4°C.

Le surnageant, constitué du plasma de l'hémolymphe, est utilisé immédiatement ou stocké à - 80°C.

3. Test de liaison des bactéries in vitro

5 Le test de liaison in vitro bactérie-plasma de l'hémolymphe a été effectué de manière substantielle comme décrit par Sun et al. (1990, Science, 250: 1729-1732).

10 10 ml de bactéries gram-négatives *E. cloacae* ou gram-positive *Bacillus licheniformis* en fin de phase de croissance logarithmique sont centrifugées, lavées et finalement resuspendues dans 200µl de Tris-HCl, 10 mM, pH 8 selon Sun et al. (1990, précédemment cités).

La suspension bactérienne est ajoutée à 1 ml de plasma d'hémolymphe immune et incubée à température ambiante avec une agitation modérée durant des périodes données.

15 Le mélange est centrifugé durant 2 minutes à 10.000 g, à 4°C, et le surnageant est éliminé avant d'effectuer un autre test de liaison.

20 Le culot est lavé successivement avec 200 µl d'une solution de NaCl dans laquelle la concentration en NaCl est augmentée de manière arithmétique après chaque lavage (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 et 0,5 M en NaCl) ou lavé deux fois dans 500 µl d'une solution de NaCl 0,5 M et finalement élué avec 200 µl d'une solution comprenant 0,5 M de NaCl et 0,1 M d'acétate d'ammonium, pH 4,0.

25 L'éluant est utilisé pour effectuer un gel SDS/PAGE.

4. Electrophorèse et immobilisation des protéines

30 L'électrophorèse sur le gel SDS-Polyacrylamide est effectuée par la méthode de Laemmli (1970; Nature 227:680) en utilisant un appareillage d'électrophorèse BioRad miniprotéane.

Le séquençage de l'extrémité N-terminale de la protéine intacte ainsi que des fragments peptidiques obtenus par clivage enzymatique in situ a été effectué à l'aide du gel Tricine SDS-PAGE (Ploug, 1989, Anal. Biochem. 181: 33-39).

35 Les protéines séparées par électrophorèse sont

transférées sur une membrane mini-Problott PVDF selon les instructions du fabricant.

5. Clivage enzymatique in situ et cartographie peptidique des séquences internes

5 Après électrophorèse, le gel est fixé dans une solution contenant 50% de méthanol et 10% d'acide acétique et teint par du noir amide durant 2 minutes.

10 Les bandes protéiques sont coupées et lavées dans de l'eau de qualité Milli Q puis remises dans le même tube et déshydratées à l'aide d'un Speed-Vac.

La digestion par l'Endopeptidase Lys-C (concentration finale: 2 µg/ml) est effectuée dans 300 µl de Tris-HCl, 0,1 M, pH 8,8, contenant 0,03% de SDS à 30°C durant 18 heures.

15 Après digestion, le milieu total de réaction est centrifugé et le surnageant est immédiatement injecté sur une colonne de Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP) (Vydac, 2,1 x 250 mm). Les fragments peptidiques sont séparés sur un gradient linéaire d'acétonitrile (0-55%) contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique durant plus de 60 minutes.

20 Un flux de 200 µl/min. est appliqué et l'absorbance est mesurée à 214 et 280 nm. Chaque pic est récupéré manuellement et stocké à -20°C pour une analyse ultérieure.

6. Analyse des séquences en acides aminés

25 La protéine intacte immobilisée sur la membrane de PVDF ou les peptides issus de la digestion enzymatique sont séparés par CHLP et sont ensuite soumis à un séquençage automatique.

La dégradation d'Edman automatique est effectuée sur un microséquenceur à phase gazeuse 477A (Applied Biosystems), connecté à un analyseur à phénylthiohydantoïne (modèle 120A).

30 7. Analyse des ADN complémentaires obtenus par amplification dans un mélange d'oligo-nucléotides (analyse MOPAC).

35 Toutes les manipulations d'ADN et d'ARN ont été effectuées en utilisant des techniques standard décrites par Sambrook et al., (1989, Molecular Cloning: A Laboratory

Manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY, 2nd Ed.).

Deux paires d'amorces ont été synthétisées: P1 (brin sens) présentant la séquence suivante:

5 P1: 5'-AA(A,G)ATGAC(A,C,G,T)(C,T)T(A,C,G,T)TT(T,C)GC(A,C,G,T)
TT-3'

et P2 qui est l'anti-sens de P1:

10 Ces deux séquences comprennent des séquences internes complémentaires de tous les codons possibles pour la séquence d'acides aminés Lys-Met-Thr-Leu-Phe-Ala-Phe.

Deux autres amorces P3 (brin sens) et P4 (brin anti-sens) ont d'autre part été synthétisées. P3 présente la séquence suivante:

15 P3: 5'-GT(A,C,G,T)TA(T,C)TA(T,C)AA(T,C)GC(A,C,G,T)GT(A,C,G,T)
TT-3'

P3 et P4 comprennent des séquences correspondant à toutes les possibilités de codons pour la séquence peptidique Val-Tyr-Tyr-Asn-Ala-Val-Phe.

20 Pour la préparation de l'ARN matrice, une larve de ver à soie au 5ème stade (jour 5) a été immunisée avec 10 µl d'une solution du complexe lipopolysaccharidique (2 mg/ml).

Après 6 heures le corps gras est récupéré et l'ARN total est extrait comme décrit par Auffray et Rougeon (1980, Eur. J. Biochem. 107: 303-314).

25 L'ADN complémentaire simple brin est synthétisé à partir de l'ARN total en utilisant les amorces anti-sens (P2 ou P4) et la transcriptase inverse du MuLV (BRL).

30 L'ADN complémentaire simple brin est amplifié avec 1 mM des oligonucléotides assemblés en paires (P1 et P4, ou P2 et P3) dans une solution contenant 10 mM de Tris-HCl, pH 8, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP et 2,5 unités de polymérase de *Thermus aquaticus* (Lee et al. 1988, Science 239: 1288-1291, et Lee et Caskey 1992, Methods in Enzymology 216: 69-72).

35 La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est effectuée en dénaturant à une température de 94°C durant 30

secondes, un anelant à 52°C durant 1 minute, puis en effectuant l'extension à 72°C durant 2 minutes, durant 30 cycles en utilisant le Tempcycler II, Model 110P (Coy Corp.).

Les aliquotes des mélanges amplifiés sont analysés sur des gels d'agarose à 2%. Les bandes teintées à l'aide d
5 bromure d'éthidium sont découpées à partir du gel et l'ADN isolé est cloné dans le plasmide pCR-Script SK (+) en utilisant la trousse de clonage PCR commercialisé par Stratagene.

10 8. Criblage des ADN complémentaires

Une librairie d'ADN complémentaires obtenue à partir du corps gras de Bombyx mori auquel on a injecté 10 heures avant des bactéries E. cloacae tuées par la chaleur, est préparée n
15 utilisant la trousse de synthèse d'ADN complémentaire lambda-gt-10 commercialisée par Amersham.

Un produit de PCR d'une longueur de 160 paires de base obtenu par analyse MOPAC (combinaisons de P1 et de P4) a été marqué au phosphore 32 par marquage aléatoire (Mega Prime DNA Labeling System, Amersham) et utilisé afin de cribler la
20 banque d'ADN complémentaires.

Environ 75.000 colonies ont été étalées à une densité d'environ 2.500 colonies par boîte de 90 mm de diamètre et criblées en utilisant des filtres de Nylon (Amersham Hybond-N). L'hybridation est effectuée en utilisant une solution
25 comprenant 6 x SSC, 2 x solution de Denhardt, 0,1% SDS, 50% formamide et de l'ADN de sperme de saumon soniqué à 100 µg/ml. Elle est effectuée à 42°C durant 14 heures avec une sond ayant une radioactivité de 10⁶ cpm/µl. (1 x SSC = 0,15M NaCl/0,015M citrate de sodium, pH 7; solution de Denhardt 0,02%, polyvinylpyrrolidone 0,02%, Ficoll 0,02%, sérum albumine bovine).

Les filtres sont lavés de manière brève dans une solution contenant 2 x SSC, SDS 0,1% à température ambiante puis sont lavés deux fois à 50°C dans une solution contenant 2
35 x SSC, SDS 0,1% durant 1 heure et autoradiographiés à -70°C n

utilisant des écrans intensifiants.

Les colonies sont hybridées avec la sonde puis recriblées et sélectionnées par séquençage.

9. Sous-clonage et stratégies de séquençage

5 Un des clones lambda gt 10 positif contenant 2,3 kb a été sous-cloné dans des vecteurs pBluescript.

Deux fragments de digestion Pst I, de 0,8 kb et 0,3 kb respectivement, ont été à nouveau sous-clonés dans des vecteurs pBluescript. Le fragment de 1,2 kb issu du sous-clonage initial a été religaturé (figure 4).

10 Le séquençage des deux brins a été effectué avec un amorce universelle M13, une amorce T3 et des amorces synthétiques en utilisant le kit de séquençage T7 commercialisé par Pharmacia ou le kit de séquençage Taq Track commercialisé par Promega.

10. Analyse par la technique de transfert de Northern

20 L'ARN total a été extrait à partir du corps gras et à partir des cellules épidermiques par précipitation directe dans une solution contenant LiCl 3M et de l'urée 6M (Auffray et Rougeon, 1980 précédemment cités).

L'ARN est séparé par électrophorèse dénaturante sur un gel d'agarose 1%-formaldéhyde avec du tampon MOPS puis est transféré sur des membranes de Nylon (Hybond-N, Amersham).

25 Le filtre est tout d'abord hybridé durant une nuit à 42°C avec de l'ADN complémentaire digéré par EcoRI/Pst I et est marqué d'une manière aléatoire par du phosphate 32 (fragment correspondant aux séquences de lecture ouvertes du fragment de 1,2 kb codant la majorité de la séquence de la protéine P-50) dans une solution contenant: 50% de formamide, 30 5 x SSC, 2x solution de Denhardt, 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé et 0,1% de SDS.

35 Le filtre est ensuite lavé de manière brève avec une solution contenant 4 x SSC et 0,1% SDS à température ambiante, deux fois à 50°C durant 20 minutes et finalement par une solution contenant 2 x SSC et 0,1% SDS durant 20 minutes à

50°C.

Après autoradiographie le filtre est déshybridé selon les instructions du fabricant et réhybridé avec la sonde Cecropin B24 de Bombyx mori (Taniai et al. 1992, Biochem. Biophys. Acta, 1132: 203-206; Brey et al. 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6275-6279) et la sonde d' α -tubuline comme témoin interne (Kalfayan et Winsink, 1981, Cell 24: 97-106).

11. Transcription in vitro, traduction in vitro et fluorographie

La synthèse d'ARN messagers synthétiques a été effectuée en utilisant un pBluescript linéarisé contenant l'insert P-50 et une ARN polymérase ADN dépendante codé par la bactériophage T7 polymérase et en utilisant la trousse de transcription d'ARN commercialisée par Stratagene.

Le système de lysat de réticulocyte de lapin (Promega) a été utilisé pour la traduction d'ARN messagers synthétiques en utilisant de la méthionine marquée au soufre ^{35}S .

Les produits de traduction in vitro ont été séparés sur gel SDS-PAGE. Après électrophorèse le gel est traité avec En^3Hance (DuPont) et fluorographié à -70°C .

12. Analyse informatique des homologues de séquence

Les logiciels FASTA, TFASTA et SwissProt ont été utilisés pour déterminer les homologues de séquences entre la P-50 et d'autres protéines connues (Argos, 1990, Methods in Enzymol. 182: 751-776).

Le logiciel DNA strider 1.1 a été utilisé pour l'analyse de l'hydrophobie.

B. RESULTATS

1. Test de liaison

Un test de liaison avec une bactérie gram-négative (*E. cloacae*), ou gram-positif (*B. licheniformis*), suivi par un lavage avec NaCl (temps d'incubation de 2,5 minutes) et une extraction acide a été effectué afin de purifier de manière sélective les protéines de l'hémolymphe ayant une affinité importante pour les surfaces bactériennes.

Les essais de bactéries ont été ensuite analysés sur gel SDS-PAGE. Le gel SDS-PAGE d'extraits de bactéries gram-négatives montre une bande prédominante correspondant à une protéine de 50 kD (figure 1A).

5 En comparant la liaison des protéines d'hémolymphe immune (figure 2, puits 2) et d'hémolymphe non-immune (figure 2, puits 3), on observe un accroissement significatif de la quantité de protéine de 50 kD (P-50) dans l'hémolymphe immun.

10 Quand on incube l'hémolymphe immune avec la bactérie testée durant différents temps d'incubation (1, 2, 5, 5, 15 et 30 minutes), la quantité de P-50 augmente avec le temps jusqu'à un temps d'incubation de 15 minutes et devient ainsi la protéine la plus abondante liée à la surface bactérienne (figure 2, colonnes 1, 2, 4, 5 et 6).

15 Dans ce test de liaison in vitro (figure 2), les bactéries sont lavées deux fois avec une solution de 0,5 M de NaCl, au lieu d'effectuer des lavages successifs, en raison du nombre important d'échantillons.

20 Après la période d'incubation de 10 minutes, le surnageant du test de liaison est réincubé avec un nouveau lot de bactéries afin de déterminer s'il reste de la P-50 dans le surnageant. Seulement des quantités non significatives de P-50 peuvent être détectées au cours de la seconde incubation de 10 minutes. Ainsi, la P-50 est en grande partie éliminée de
25 l'hémolymphe immune durant la première incubation de 10 minutes.

Un β -1,3-glucane insoluble (curdian) a été mis en oeuvre dans d'autres tests de liaison in vitro, à des concentrations finales de 3 mg/ml d'hémolymphe immune. Après
30 une incubation de 10 minutes, le culot est lavé deux fois avec une solution de NaCl 0,5 M et l'extrait acide est analysé sur SDS-PAGE. La P-50 est détectée, avec des protéines contaminantes mineures.

2. Purification et séquençage des acides aminés

35 Les protéines éluées lors du test de liaison sont

séparées sur Tricine-SDS-PAGE et la bande de protéine correspondant à un poids moléculaire de 50 kD est soumise à une digestion par une protéinase in situ afin d'effectuer une analyse de la séquence en acides aminés interne, car la protéine de 50 kD intacte n'est pas sensible à la dégradation d'Edman en raison de ses groupes α -aminés bloqués.

Une série de bandes correspondant à la P-50 (environ 15 μ g) est découpée à partir du gel, déshydratée et digérée in situ en utilisant l'endopeptidase Lys-C.

Les fragments peptidiques résultant sont séparés par CHLP en phase inverse (figure 1B) et leur structure primaire est déterminée par un séquençage automatique des acides aminés.

Les séquences qui ont été déterminées sont les suivantes:

- pic correspondant à la flèche noire:

2 bandes - bande majeure: DVVYYNAVFSINK

- bande mineure: MTLFAFXGNLNXK

- pic correspondant à la flèche blanche:

LDSTSVGTLSEVLDPVNGRXVYEEPDLK

3. Analyse MOPAC et isolement de l'ADN complémentaire codant pour la P-50

En utilisant les données obtenues concernant la séquence interne en acides aminés de la P-50, des amorces dégénérées ont été synthétisées (P 1 et P 3 pour le brin sens, P 2 et P 4 pour le brin anti-sens) (Figure 3A).

Une amplification PCR est effectuée comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes en utilisant de l'ADN complémentaire simple brin de corps gras de vers à soie immuns (combinaison de P 1 et P 4 ou P 3 et P 2). Seule une combinaison d'amorces (P 1 et P 4) donne naissance à un produit de 160 paires de base (pb) comme le montre la figure 3B.

Le produit de 160 paires de base est cloné et séquencé. La séquence en acides aminés déduite de la séquence de 160 paires de base contient les trois fragments peptidiques de la

5 P-50, comme analysé par la dégradation d'Edman. La banque d'ADN complémentaire construite à partir de corps gras de ver à soie immunisé est criblée en utilisant le produit de 160 paires de base marqué d'une manière aléatoire par du phosphore 32, comme sonde.

40 clones positifs sont isolés après criblage d'environ 75.000 clones indépendants. Parmi treize clones positifs choisis de manière aléatoire, tous ont le même insert de taille identique (2,3 kb) à l'exception d'un clone qui
10 présente un insert de 1,8 kb.

La séquence nucléotidique d'un de ces clones (lambda BP5001) contenant un des inserts de 2,3 kb a été analysée ci-dessous.

15 4. Séquence nucléotidique et séquence en acides aminés déduite

Le fragment EcoR I du clone lambdaBP5001 a été sous-cloné dans le plasmide pBluescript.

Des sous-clonages ont été effectués comme décrits dans le chapitre Matériels et Méthodes. La carte de restriction
20 utilisée pour le sous-clonage est celle de la figure 4.

La séquence nucléotidique et la séquence en amino acides déduite sont celles répertoriées SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2.

La séquence de lambdaPB5001 contient une région non
25 codante à son extrémité 5' et une phase de lecture ouverte d 1401 nucléotides correspondant à 467 acides aminés. Une région non traduite de 1100 nucléotides est aussi présente entre le codon stop et le site de polyadénylation. Cette séquence contient deux signaux possibles de polyadénylation (AATAAA),
30 ce qui pourrait correspondre à l'existence d'ARN messagers de différentes tailles.

On a aussi trouvé six séquences ATTTA dans la région proche de l'extrémité 3' de la phase de lecture ouverte, ce qui suggère une certaine instabilité des ARN messagers de la
35 protéine P-50.

Le poids moléculaire calculé de la protéine déduite de la séquence d'ADN complémentaire est de 52.225D.

5 L'analyse de l'hydrophobicité de la séquence montre que les dix huit premiers aminoacides correspondent à un profil typique de peptide signal (figure 5).

La partie C-terminale de la protéine P-50 est aussi très hydrophobe ce qui suggère l'existence d'un ancrage membranaire. La protéine déduite contient aussi un site potentiel de N-glycosylation sur son acide aminé en position 10 182.

5. Comparaison de la séquence en acides aminés de la protéine P-50 et d'autres protéines

L'ADN complémentaire de la protéine P-50 a une homologie de séquence significative avec certains domaines de quatre protéines différentes présentant une relation du point de vue immun: β -1,3 glucanase bactérienne, protéine liant le complexe lipopolysaccharidique humain (LBP), protéine augmentant la perméabilité humaine (BPI) et CD14 humain.

a) β -1,3 glucanase

20 L'homologie de séquence la plus importante est obtenue avec l'ADN complémentaire de la β -1,3 glucanase A1 de Bacillus circulans WL-12 (Yahata et al., 1990, Gene 86, 113-117). 34% d'identité et 56% de similarité sur un ensemble de 124 aminoacides (figure 6).

25 Cette région de 124 aminoacides contient le site actif supposé hautement conservé (19 acides aminés) d'ailleurs les β -1,3-1,4 glucanases que les β -1,3-1,4 glucanases (Schimming et al., 1992, Eur. J. Biochem., 204, 13-19; Hofemeister et al., 1986, Gene 49: 177-187) comme le montre la figure 6.

30 Dans cette région, la P-50 montre une identité de structure de 53% et une similarité de 63% avec la β -1,3 glucanase de Bacillus circulans et une identité de 53% et une similarité de 90% avec la β -1,3-1,4 glucanase de Fibrobacter succinogenes (Teather et Erfle, 1990, J. Bacteriol. 172: 3837-35 3841) incluant les résidus histidine et acide aspartique

strictement conservés du site actif supposé.

b) LBP/BPI

On observe aussi une homologie de séquence significative avec le domaine de liaison du LPS des LBP et BPI humaines (Schumann et al., 1990, Science 249:1429; Hoess et al., 1993, EMBO J. Vol. 12 N°9 3351-3356) comme le montre la figure 7. Dans ce domaine de 19 acides aminés, on observe une identité de 21%, et une similarité de 47% avec la LBP et une identité de 21% et une similarité de 53% avec la BPI.

Si le domaine de liaison consensus de la LBP ou de la BPI est comparé avec la P-50 on obtient une identité de 37% et une similarité de 68%. (figure 7).

c) CD14

Une autre protéine humaine impliquée dans le complexe de liaison LPS/LBP ou dans la liaison du LPS est le CD14. Cette protéine montre une identité de 21% et une similarité de 46%.

6. Traduction in vitro

Afin de confirmer l'identité du produit du gène cloné, le lambdaBP5001 est linéarisé par digestion Bgl II et la transcription est effectuée in vitro.

Les ARN messagers résultants sont traduits in vitro en utilisant le lysat de réticulocyte de lapin en présence de ³⁵S-méthionine.

Les mélanges réactionnels sont ensuite séparés par SDS-PAGE et fluorographiés. La protéine traduite a un poids moléculaire estimé de l'ordre de 52 kD comme le montre la figure 8. Ceci est en accord avec le poids moléculaire calculé à partir de la séquence en acides aminés déduite.

7. Induction d'ARN messagers codant pour la P-50 en réponse à l'infection bactérienne en utilisant des larves de Bombyx mori axéniques

La quantité de protéine P-50 dans l'hémolymphe augmente de manière importante après mise en contact avec des bactéries comme le montre la figure 1.

L'induction des ARN messagers codant pour la P-50 suivant l'abrasion procuticulaire a été examinée avec des larves de Bombyx mori axéniques.

5 Le lambdaBP5001 a été digéré par Pst 1/EcoR 1 et le fragment de 1,2 kb en résultant, et contenant la majeure partie de la région codant pour la protéine P-50, a été purifié, marqué de manière aléatoire par du ^{32}P et utilisé comme sonde pour un transfert de type Northern (Northern blot).

10 L'ARN messager de la P-50 est exprimé de manière constitutive à faible taux dans le corps gras et dans les cellules épidermiques de larves n'ayant pas subi d'abrasion procuticulaire (figure 9A).

15 Six heures après l'abrasion procuticulaire en présence de bactéries, les ARN messagers sont induits de manière forte dans le corps gras et, à un degré moindre, dans les cellules épidermiques.

20 Même une abrasion stérile en l'absence stricte de bactéries est capable d'induire des ARN messagers dans les deux tissus six heures après l'abrasion (figure 9A).

Afin d'avoir un témoin positif, l'ADN transféré (blot) est déshybridé et réhybridé avec le gène exprimé de manière constitutive de l' α -tubuline et d'une autre protéine intervenant dans l'immunité induite, la cecropine B2.

25 Les résultats de la figure 9B montrent que la P-50 est une protéine de phase aiguë qui joue un rôle important dans la réponse immune de Bombyx mori.

30 L'ensemble des résultats de cet exemple montre que la protéine P50 lie le LPS et joue un rôle important dans la réponse immunitaire.

EXEMPLE 2:1) - OBTENTION DES PLANTS DE TABAC TRANSGENIQUES ET
MISES EN EVIDENCE DE LA RESISTANCE A L'INFECTION
FONGIQUE

5 L'ADN complémentaire de la protéine P-50 obtenu dans
l'exemple 1 est cloné dans les sites EcoRI des plasmides
pMON530 et pBI 121 (Jaynes et al., 1993, Plant Scienc , 89,
45-53). L'ADN complémentaire inséré est placé sous le contrôle
10 du promoteur de la protéinase II issue de la pomme de terre
(Jaynes et al. 1993, Science, 89, 43-53).

Des disques foliaires de 1 cm de diamètre environ sont
découpés dans des feuilles de plants de tabac vieux de six
semaines (Nicotiana tabacum var. xanthii et var. samsung) qui
ont été cultivés de manière aseptique dans des boîtes d
15 Magenta.

Les disques foliaires sont obtenus en poinçonnant de
jeunes feuilles en utilisant un poinçon stérilisé. Les
explants sont précultivés durant 1 à 2 jours sur un milieu
MS104 (MSO, 7 g/l de phytoagar, 1 mg/ml de benzyladenine et
20 0,1 mg/ml d'acide naphthalène acétique) pour stimuler la
croissance. Le milieu MSO comprend 4,3 g/l de sel de Murashig
et Skoog et 30 g/l de saccharose.

Les explants sont inoculés en les immergeant durant 2 à
10 secondes dans une culture effectuée durant une nuit
25 d'Agrobacterium tumefaciens. L'eau des explants est ensuite
absorbée et les explants sont mis en culture sur des boîtes de
culture nourrice. Chaque boîte de culture nourrice est
préparée en utilisant du milieu MS104 auquel a été ajouté 1,5
ml de suspension de culture de tabac. Ces boîtes sont
30 couvertes avec un morceau de papier filtre Whatman 3mm.

Les explants sont ensuite laissés à incuber durant 2
jours puis transférés sur un milieu de sélection MS (MS104,
500 mg/ml de carbénicilline ou de céfatoxime, 300 mg/ml de
kanamycine).

35 Quand les tiges apparaissent, les explants sont

transférés sur un milieu d'enracinage MS (MSO av c 0,6% d'agar, 500 mg/ml de carbénicilline et 100 mg/ml d kanamycine). Les pieds sortant des explants et présentant des tiges bien définies sont découpés et repiqués dans un nouveau milieu d'enracinage.

Les plantules qui développent des racines d'environ 2 semaines dans les milieux d'enracinage sont alors transférées dans un sol stérile dans des pots Jiffy et mis dans des boîtes de Magenta stérilisées.

Après 7 à 10 jours, les couvercles des boîtes de Magenta sont réouvertes afin d'acclimater les plantes. Les plantes sont ensuite transférées dans des pots durant deux semaines puis dans des pots plus gros et mises en croissance dans une serre sous une lumière naturelle. Elles sont arrosées quotidiennement avec une solution 20:20:20 (N/K/P). La température moyenne est d'environ 32°C.

Des cultures nourrice de cellules de tabac (*Nicotiana tabacum* var. *xanthii*) sont utilisées durant la co-culture des explants avec les bactéries *Agrobacterium* afin d'améliorer l'efficacité de transformation. Des suspensions de culture sont maintenues dans des flasques d'Erlenmeyer contenant 50 ml de suspension de culture (4,3 g/l de sel MS, 30 g/l de saccharose, 5 ml/l de vitamine B5, 1 mg/l de 2,4-D). Les cultures sont conservées à température ambiante avec une agitation constante de 150 révolutions/minute. Les suspensions cellulaires sont maintenues en faisant des sous-cultures de 10 ml de culture, filtrées et lavées, dans 50 ml de milieu.

L'expression du gène codant pour la P-50 est mise en évidence en dosant le taux d'ARN par une analyse de transfert de type Northern (Northern blot).

L'expression de la P-50 dans les plants de tabac est analysée en utilisant la méthode décrite par Sanchez-Serrano et al. (1987, EMBO J. 6, 303-306).

Des pinces de dialyse sont posées sur des feuilles de plants de tabac hauts de 60 à 80 cm. Les ARN sont isolés à

partir de feuilles des plants sur lesquelles ont été posées les pinces de dialyse, 6, 12 et 24 h ures après la pose. Les ARN Poly(A) sont isolés en utilisant la trousse FastTrackTM oligo dT cellulose (commercialisée par Invitrogen). 10 µg par échantillon sont chargés sur le gel. L'insert d'ADN complémentaire de la P-50 de 1200 pb est utilisé comme sond. Les protéines totales sont extraites des feuilles de tabac par une solution contenant tris-HCl (pH 6,8) 80 mM, SDS 2%, glycérol 10% et sont séparées sur des gels de polyacrylamide dénaturant à 13%, à raison de 20 µg de protéines totales par échantillon. Les protéines sont ensuite transférées sur un membrane Immobilon-P commercialisée par Millipore. La membrane est incubée avec un antisérum dirigé contre la P-50 en utilisant les techniques d'analyse Western conventionnelles. La détection des protéines immunoréactives est effectué en utilisant la technique de luminescence Amersham ECL.

2) - RESISTANCE DES PLANTS OBTENUS A L'ENCONTRE D'UNE INFECTION FONGIQUE

Phytophthora syringae, qui est très virulent à l'encontre du tabac est utilisé dans les tests d'inoculation. Des zoospores suspendus dans de l'eau à différentes densités cellulaires sont utilisés comme inoculum. Des jeunes plants de tabac résistants à la kanamycine sont obtenus à partir de graines de la génération R1, soit témoins soit issues de plantes transgéniques pour la P50, et transplantés directement dans des pots contenant un sol artificiel (Pro-Mix) puis mis en culture dans une serre. Les plants témoins sont transgéniques pour le vecteur de transfert ne contenant pas l'insert P-50.

Les plantes utilisées dans le test vis-à-vis de l'infection fongique sont mises à croître dans des petits pots jusqu'à ce qu'elles atteignent une hauteur d'environ 10 cm, puis la bordure de 4 à 5 feuilles est entaillée. Toutes les racines du même côté du plant, à mi-chemin entre le pied et la paroi du pot, sont coupées. Les pots sont placés dans des

soucoupes et 5 ml de zoospores suspendus dans de l'eau à raison de 10^7 cellules par ml sont versées dans le sol. Les plants témoins ne reçoivent que de l'eau.

5 Les plants sont disposés de manière aléatoire et codés afin d'obtenir des conditions de simple aveugle.

Les plants sont incubés à 30°C dans des chambres de croissance et le sol est conservé humide par trempage dans des soucoupes.

10 Le pourcentage des feuilles entaillées qui dépérissent est noté pour chaque plante, chaque jour, et le pourcentage moyen de feuilles ayant dépéri en fonction de chaque traitement est calculé. Quant toutes les feuilles entaillées ont dépéri, le plant est considéré comme ayant dépéri lui-même. Les nouvelles feuilles qui apparaissent durant le test
15 ne sont pas comptées même si elles semblent dépérir de manière considérable. Les résultats sont analysés en utilisant le t st des deux échantillons de Wilcoxon en comparant les valeurs moyennes entre témoins et plantes transgéniques.

20 Un autre test consiste à mettre les plantes du test d'inoculation en croissance dans des pots jusqu'à ce qu'elles atteignent une hauteur de 15 cm et les bords de 8 à 10 feuilles sont échancrés comme décrit ci-dessus. Chacun d s plants reçoit 20 μ m d'un inoculum contenant 10^6 cellules/ml ou 20 μ l d'eau appliqué par l'intermédiaire d'une blessur au
25 couteau faite à la base. Les feuilles échancrées sur chaque plante sont estimées chaque jour pour leur degré de dépérissement. Le pourcentage de feuilles et de plantes ayant dépéri est calculé comme dans le cas de la méthode d'inoculation par les racines.

30 Le procédé décrit dans cet exemple permet d'obtenir d s plantes résistantes aux infections fongiques.

EXEMPLE 3:

NEUTRALISATION DES ENDOTOXINES

35 L'ADN complémentaire de la protéine P-50 est xprimé dans un système eucaryote ou bactérien selon les techniques

décrit s par Sambrook et al. (1989, précédemment cités). La P-50 est purifiée selon les techniques décrites par Das, (1990, Methods in Enzymology 182, 93-112) et Bradley (1990, Methods in Enzymology 182, 112-132). La P-50 purifiée obtenue de cette
5 manière est utilisée dans des tests d'activité biologique.

TEST DE NEUTRALISATION DE L'ENDOTOXINE

100 pg d'endotoxine d'Escherichia coli O113 sont ajoutés à des dilutions en série de la protéine P-50. L'activité de l'endotoxine est quantifiée par le test
10 turbidimétrique décrit par Novisky et al., (1985, J. Clin. Micro, 20, 211-216) pour le facteur anti-LPS de Limulus.

D'autres échantillons de LPS sont testés tels que ceux de Klebsiella pneumoniae, Serratia marcesens et Serratia minnesota. La neutralisation de ces différentes espèces est
15 effectuée avec un excès cinq fois plus important de P-50 par rapport au LPS.

TEST DE NEUTRALISATION DU SERUM

Afin de tester l'efficacité potentielle de la P-50 in vivo, la protéine a été testée pour sa capacité à inactiver
20 l'endotoxine en présence d'un sérum de rat total.

Un test est effectué dans des plaques de 96 puits comme décrit par Novitsky et al. (précédemment cités).

A chaque puits on ajoute dans l'ordre 0,05 ml de sérum ou 0,5 ml de sérum avec 25 mg/ml de P-50, puis 0,5 ml
25 d'endotoxine d'Escherichia coli O113.

Les plaques sont couvertes avec un film de Parafilm afin d'éviter l'évaporation, agitées sur une plateforme d'agitation mécanique durant 15 minutes et incubées à 37°C
durant 1 heure.

30 Le film plastique couvrant les plaques est retiré puis 0,1 ml de LAL est ajouté à chaque puits qui est testé comme décrit ci-dessus.

Le LR50 est défini comme étant la moitié de la croissance maximale de la densité optique par rapport au
35 témoin.

EXEMPLE 4:Protection des animaux par la protéine P-50

Des rats mâles Sprague-Dawley (230-450g) sont anesthésiés légèrement avec de l'Halothane. On leur injecte
5 alors une solution à tester par l'intermédiaire de la veine dorsale du pénis.

Les rats témoins reçoivent une solution contenant un tampon phosphate-salin (0,15 NaCl) tamponné à pH 7,4 et contenant 0,02 M de phosphate de sodium. Un second groupe de
10 rats reçoit du LPS (E. coli 0111: B4, Sigma Chemical Company) dans du tampon.

Un troisième groupe de rats est testé avec une suspension de protéine P-50 et de LPS mélangés dans des quantités égales en poids dans du tampon et incubé durant 1
15 heure à 37°C avant injection.

Un quatrième groupe de rats reçoit de l'albumine mélangée avec du LPS dans des quantités égales en poids et incubée d'une manière similaire.

Le dernier groupe de rats est traité par injection avec
20 seulement la P-50 incubée dans du tampon.

Le volume injecté (1,7 - 2,9 ml) dépend du poids du rat qui est ajusté de façon à fournir une dose de 15 mg de LPS par kilo corporel.

La survie des rats est suivie durant 24 heures.

25 Le procédé décrit ci-dessus permet de mettre en évidence l'activité thérapeutique de la protéine P50, sur un modèle animal représentatif.

Conclusion

30 Les résultats de ces quatre exemples mettent en évidence les propriétés remarquables de la protéine P50 et ses applications thérapeutiques pharmaceutiques et agronomiques.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: INSTITUT PASTEUR
- (B) RUE: 28, rue du Docteur Roux
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75724
- (G) TELEPHONE: 45688097
- (H) TELECOPIE: 40613017

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Protéines liant le complexe lipopolysaccharidique (LPS), et leurs utilisations

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 5

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 19 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Bombyx mori

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Arg	Ile	Ser	Val	Gln	Asp	Val	Pro	Lys	Met	Thr	Leu	Phe	Ala	Phe	Gln
1				5				10						15	
Gly Asn Leu															

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 19 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Bombyx mori

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Phe His Thr Tyr Ser Val Gln Trp Thr Pro Asp Phe Ile Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 Val Asp Gly

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 455 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Bombyx mori

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Lys Ile Ser Tyr Ala Gln Met Pro Asp Val Lys Ile Gln Ala Phe Arg
 1 5 10 15
 Pro Lys Gly Leu Arg Ile Ser Val Gln Asp Val Pro Lys Met Thr Leu
 20 25 30
 Phe Ala Phe Gln Gly Asn Leu Asn His Lys Leu Asp Ser Thr Ser Val
 35 40 45
 Gly Thr Leu Ser Ala Glu Val Leu Asp Pro Val Asn Gly Arg Trp Val
 50 55 60
 Tyr Glu Glu Pro Asp Leu Lys Leu Lys Val Lys Asp Val Val Tyr Tyr
 65 70 75 80

Asn Ala Val Phe Ser Ile Asn Lys Lys Ile Tyr Glu Lys Thr Asn Gln
 85 90 95
 Gln Phe Thr Val Thr Glu Leu Glu Asp Pro Asn Ala Ser Thr Asp Ser
 100 105 110
 Gln Lys Pro Glu Cys Lys Pro Thr Lys Thr Arg Val Arg Gly Gly Lys
 115 120 125
 Ala Cys Ala Gly Gln Thr Ile Phe Glu Glu Gln Phe Asp Ser Leu Asp
 130 135 140
 Glu Asn Val Trp Gln Ile Glu Gln Tyr Ile Pro Ile Tyr His Pro Glu
 145 150 155 160
 Tyr Pro Phe Val Ser Tyr Gln Arg Asn Asn Leu Thr Val Ser Thr Ala
 165 170 175
 Asp Gly Asn Leu His Ile Asn Ala Lys Leu Gln Gln His Met Pro Gly
 180 185 190
 Phe Leu Asp Asp Ser Ile Tyr Ser Gly Thr Leu Asn Leu Phe Ser Gly
 195 200 205
 Cys Thr Ser Ser Ala Glu Ala Cys Ile Lys Gln Ala Ser Gly Ala Asp
 210 215 220
 Ile Leu Pro Pro Ile Val Ser Gly Arg Ile Thr Ser Ile Gly Phe Ala
 225 230 235 240
 Phe Thr Tyr Gly Thr Val Glu Ile Arg Ala Lys Leu Pro Gln Gly Asp
 245 250 255
 Trp Leu Tyr Pro Glu Ile Leu Leu Glu Pro Phe Leu Lys Lys Tyr Gly
 260 265 270
 Ser Met Asn Tyr Ala Ser Gly Val Val Lys Ile Ala Cys Ala Arg Gly
 275 280 285
 Asn Ala Glu Leu Tyr Ser Gly Pro Asn Asp Tyr Ser Asn Thr Val Leu
 290 295 300
 Tyr Gly Gly Pro Ile Met Asp Leu Glu Cys Arg Glu Asn Phe Leu Ser
 305 310 315 320
 Thr Lys Arg Arg Arg Asp Gly Thr Ser Trp Gly Asp Ser Phe His Thr
 325 330 335
 Tyr Ser Val Gln Trp Thr Pro Asp Phe Ile Ala Leu Ser Val Asp Gly
 340 345 350
 Glu Glu Trp Ala Arg Val Glu Ala Pro Arg Asp Ala Leu Pro Ala Val
 355 360 365
 Cys Ala His Ala Pro Arg His Leu Leu Gln Ala Gly Ser Gln Met Ala
 370 375 380

Pro Phe Asp Asp His Phe Tyr Ile Thr Leu Gly Val Ala Ala Gly Gly
 385 390 395 400
 Ile Thr Glu Phe Arg Asp Gly Ser Ile Thr Ser Gly Gly Val Thr Lys
 405 410 415
 Pro Trp Arg Asp Ser Ala Arg Lys Ala Ser Val His Phe Trp Arg His
 420 425 430
 Met Ser Asp Trp Phe Pro Arg Trp Ser Gln Pro Ser Leu Ile Val Asp
 435 440 445
 Phe Val Lys Val Ile Ala Leu
 450 455

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 2271 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Bombyx mori

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMENT: 16..1416

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GAGGATCCGG GTACC ATG GGT GGA CGC GTG TTG TGT CTG ATT TTA TTT ATA	51
Met Gly Gly Arg Val Leu Cys Leu Ile Leu Phe Ile	
1 5 10	
AAA ATA TCG TAC GCT CAA ATG CCC GAT GTG AAA ATA CAA GCT TTT CGC	99
Lys Ile Ser Tyr Ala Gln Met Pro Asp Val Lys Ile Gln Ala Phe Arg	
15 20 25	
CCG AAA GGA CTT CGA ATA TCC GTT CAA GAT GTC CCC AAA ATG ACA CTG	147
Pro Lys Gly Leu Arg Ile Ser Val Gln Asp Val Pro Lys Met Thr Leu	
30 35 40	
TTC GCG TTC CAA GGC AAC TTG AAC CAT AAA CTG GAC AGC ACC AGC GTC	195
Phe Ala Phe Gln Gly Asn Leu Asn His Lys Leu Asp Ser Thr Ser Val	
45 50 55 60	
GGG ACA CTG AGT GCA GAG GTA CTG GAT CCA GTC AAC GGC CGA TGG GTG	243
Gly Thr Leu Ser Ala Glu Val Leu Asp Pro Val Asn Gly Arg Trp Val	
65 70 75	

TAC Tyr	GAA Glu	GAG Glu	CCC Pro	GAT Asp	CTT Leu	AAA Lys	CTA Leu	AAA Lys	GTC Val	AAG Lys	GAC Asp	GTC Val	GTC Val	TAT Tyr	TAT Tyr	291
			80					35					90			
AAC Asn	GCG Ala	GTC Val	TTC Phe	TCA Ser	ATC Ile	AAC Asn	AAG Lys	AAA Lys	ATA Ile	TAC Tyr	GAG Glu	AAA Lys	ACA Thr	AAC Asn	CAA Gln	339
		95					100					105				
CAG Gln	TTC Phe	ACC Thr	GTA Val	ACA Thr	GAG Glu	CTA Leu	GAA Glu	GAT Asp	CCT Pro	AAT Asn	GCA Ala	AGC Ser	ACA Thr	GAT Asp	TCT Ser	387
	110					115					120					
CAG Gln	AAA Lys	CCA Pro	GAA Glu	TGT Cys	AAG Lys	CCA Pro	ACA Thr	AAG Lys	ACG Thr	AGA Arg	GTG Val	CGA Arg	GGC Gly	GGC Gly	AAA Lys	435
	125				130					135					140	
GCG Ala	TGT Cys	GCC Ala	GGA Gly	CAA Gln	ACA Thr	ATA Ile	TTC Phe	GAG Glu	GAG Glu	CAA Gln	TTT Phe	GAT Asp	TCC Ser	CTG Leu	GAC Asp	483
				145					150					155		
GAA Glu	AAC Asn	GTT Val	TGG Trp	CAA Gln	ATC Ile	GAG Glu	CAG Gln	TAT Tyr	ATA Ile	CCG Pro	ATT Ile	TAT Tyr	CAC His	CCC Pro	GAA Glu	531
			160					165					170			
TAC Tyr	CCC Pro	TTC Phe	GTG Val	TCC Ser	TAC Tyr	CAG Gln	CGT Arg	AAT Asn	AAT Asn	TTA Leu	ACA Thr	GTA Val	TCT Ser	ACC Thr	GCA Ala	579
		175					180					185				
GAT Asp	GGA Gly	AAC Asn	CTA Leu	CAT His	ATT Ile	AAC Asn	GCC Ala	AAA Lys	CTT Leu	CAA Gln	CAA Gln	CAT His	ATG Met	CCC Pro	GGC Gly	627
	190					195					200					
TTT Phe	CTG Leu	GAC Asp	GAC Asp	TCT Ser	ATA Ile	TAT Tyr	TCT Ser	GGC Gly	ACA Thr	CTT Leu	AAT Asn	TTG Leu	TTC Phe	AGT Ser	GGG Gly	675
	205				210					215					220	
TGT Cys	ACT Thr	TCG Ser	TCA Ser	GCA Ala	GAG Glu	GCA Ala	TGC Cys	ATC Ile	AAA Lys	CAG Gln	GCT Ala	TCC Ser	GGT Gly	GCT Ala	GAT Asp	723
				225					230				235			
ATT Ile	CTA Leu	CCA Pro	CCA Pro	ATC Ile	GTC Val	AGC Ser	GGC Gly	AGA Arg	ATC Ile	ACA Thr	TCA Ser	ATA Ile	GGA Gly	TTT Phe	GCA Ala	771
			240					245					250			
TTT Phe	ACG Thr	TAC Tyr	GGA Gly	ACA Thr	GTC Val	GAA Glu	ATC Ile	AGA Arg	CCG Ala	AAA Lys	TTA Leu	CCG Pro	CAA Gln	GGG Gly	GAC Asp	819
		255					260					265				
TGG Trp	CTG Leu	TAT Tyr	CCG Pro	GAA Glu	ATT Ile	CTA Leu	TTG Leu	GAG Glu	CCG Pro	TTC Phe	TTA Leu	AAG Lys	AAG Lys	TAT Tyr	GGA Gly	867
	270					275					280					
AGT Ser	ATG Met	AAT Asn	TAT Tyr	GCG Ala	TCC Ser	GGC Gly	GTA Val	GTG Val	AAG Lys	ATA Ile	GCG Ala	TGT Cys	GCG Ala	CGC Arg	GGT Gly	915
	285				290					295					300	

AAT GCA GAA CTC TAT TCC GGA CCT AAT GAC TAC AGC AAT ACG GTT TTG Asn Ala Glu Leu Tyr Ser Gly Pro Asn Asp Tyr Ser Asn Thr Val Leu 305 310 315	963
TAC GGA GGA CCG ATC ATG GAT CTG GAG TGC CGC GAG AAC TTT CTC TCC Tyr Gly Gly Pro Ile Met Asp Leu Glu Cys Arg Glu Asn Phe Leu Ser 320 325 330	1011
ACA AAA AGA CGC AGA GAC GGC ACG TCG TGG GGC GAC AGT TTT CAT ACA Thr Lys Arg Arg Arg Asp Gly Thr Ser Trp Gly Asp Ser Phe His Thr 335 340 345	1059
TAT TCC GTT CAA TGG ACA CCT GAT TTC ATA GCC CTG TCT GTG GAC GGC Tyr Ser Val Gln Trp Thr Pro Asp Phe Ile Ala Leu Ser Val Asp Gly 350 355 360	1107
GAG GAG TGG GCG CGA GTG GAG GCG CCG CGG GAC GCC CTG CCG GCT GTC Glu Glu Trp Ala Arg Val Glu Ala Pro Arg Asp Ala Leu Pro Ala Val 365 370 375 380	1155
TGC GCG CAC GCC CCG CGG CAC CTG CTG CAG GCC GGC TCG CAG ATG GCG Cys Ala His Ala Pro Arg His Leu Leu Gln Ala Gly Ser Gln Met Ala 385 390 395	1203
CCA TTC GAT GAC CAC TTC TAC ATA ACG CTA GGC GTG GCG GCA GGA GGC Pro Phe Asp Asp His Phe Tyr Ile Thr Leu Gly Val Ala Ala Gly Gly 400 405 410	1251
ATA ACG GAG TTC CGC GAC GGG TCT ATA ACC TCC GGG GGA GTC ACC AAG Ile Thr Glu Phe Arg Asp Gly Ser Ile Thr Ser Gly Gly Val Thr Lys 415 420 425	1299
CCC TGG AGA GAC AGC GCT CGG AAG GCA TCC GTA CAT TTC TGG CGG CAC Pro Trp Arg Asp Ser Ala Arg Lys Ala Ser Val His Phe Trp Arg His 430 435 440	1347
ATG TCC GAT TGG TTC CCA CGG TGG AGT CAG CCA TCT TTA ATC GTG GAC Met Ser Asp Trp Phe Pro Arg Trp Ser Gln Pro Ser Leu Ile Val Asp 445 450 455 460	1395
TTT GTC AAA GTT ATC GCC TTA TGATCTAGTC ATTTAGATTT TGTATAATTA Phe Val Lys Val Ile Ala Leu 465	1446
AGTTATTAGT ATAGTTTCTG CAGGCAAAAT TAATTGCATT CTGAGTTTTT ATTGTCAAAC	1506
TACAATTTAA AATTTAATTC CTAAAAGATC TCTCTTCTTT CTAAATCTGT AATTTAGCTA	1566
ATTTTATTTG TATCATTTTC TTTTTTTAAA TTTTGATAGA GCGGCGAATG ACTAGAAGAT	1626
GTGATCTGCG AAAATAAAAC TAAGTGACAT GCATGCAAAG GCATACACAC AACAGAGTTT	1686
TGCATTATTA TTACCTTTCT TGAGCGAGAT GAGGACTACT SACGTGACCT GGAGTGATAT	1746
TTTGGAGCAA GCCTAAGACA GGGTCAAGTG GAGACAGCTC TAAGGCCCCCT ATGTACCGGC	1806
GGGGTGTCTT AGGGCTGCAA TAACAACATT ACCTTTCTTA ACCAAACAGC GATATTATCT	1866

GTAATATTAT AGTTAGAAAG CCTGCATCTT ATACTCTTAT TGACACACGT ACCTGGATGA 1926
 TTTTAACGAT GAAGAAATAA CATCGTGTA AAAATTTAGC TGGAAAAGAT TTTGAGGAAT 1986
 CAAGAAATAC CCTATGAACC AGCACAGGTA CSTGTCACCA CTCTGGCTAA TTCTGCCACG 2046
 TTGCGGTTGG TTTGAAGTTT GAGACAACCT TTGCACGATA CAATTGAGAC TAAGACCTCA 2106
 TGGCTCGGAG TGAGTGGAGT CATTCAAGTT GCGACTGGCT CCAGTAACCA CTTATAACCA 2166
 GGTAGATCGT GAGCCTATCA GCTCATTTAG AGCAACAAAA AACAAAATAA TGTACTCTTG 2226
 AAAAAATCAT TTTAATAAAA GACCAGAGTG AAAAAAAAAA AAAAA 2271

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 467 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

Met	Gly	Gly	Arg	Val	Leu	Cys	Leu	Ile	Leu	Phe	Ile	Lys	Ile	Ser	Tyr	1	5	10	15
Ala	Gln	Met	Pro	Asp	Val	Lys	Ile	Gln	Ala	Phe	Arg	Pro	Lys	Gly	Leu	20	25	30	
Arg	Ile	Ser	Val	Gln	Asp	Val	Pro	Lys	Met	Thr	Leu	Phe	Ala	Phe	Gln	35	40	45	
Gly	Asn	Leu	Asn	His	Lys	Leu	Asp	Ser	Thr	Ser	Val	Gly	Thr	Leu	Ser	50	55	60	
Ala	Glu	Val	Leu	Asp	Pro	Val	Asn	Gly	Arg	Trp	Val	Tyr	Glu	Glu	Pro	65	70	75	80
Asp	Leu	Lys	Leu	Lys	Val	Lys	Asp	Val	Val	Tyr	Tyr	Asn	Ala	Val	Phe	85	90	95	
Ser	Ile	Asn	Lys	Lys	Ile	Tyr	Glu	Lys	Thr	Asn	Gln	Gln	Phe	Thr	Val	100	105	110	
Thr	Glu	Leu	Glu	Asp	Pro	Asn	Ala	Ser	Thr	Asp	Ser	Gln	Lys	Pro	Glu	115	120	125	
Cys	Lys	Pro	Thr	Lys	Thr	Arg	Val	Arg	Gly	Gly	Lys	Ala	Cys	Ala	Gly	130	135	140	
Gln	Thr	Ile	Phe	Glu	Glu	Gln	Phe	Asp	Ser	Leu	Asp	Glu	Asn	Val	Trp	145	150	155	160

Gln Ile Glu Gln Tyr Ile Pro Ile Tyr His Pro Glu Tyr Pro Phe Val
 165 170 175
 Ser Tyr Gln Arg Asn Asn Leu Thr Val Ser Thr Ala Asp Gly Asn Leu
 180 185 190
 His Ile Asn Ala Lys Leu Gln Gln His Met Pro Gly Phe Leu Asp Asp
 195 200 205
 Ser Ile Tyr Ser Gly Thr Leu Asn Leu Phe Ser Gly Cys Thr Ser Ser
 210 215 220
 Ala Glu Ala Cys Ile Lys Gln Ala Ser Gly Ala Asp Ile Leu Pro Pro
 225 230 235 240
 Ile Val Ser Gly Arg Ile Thr Ser Ile Gly Phe Ala Phe Thr Tyr Gly
 245 250 255
 Thr Val Glu Ile Arg Ala Lys Leu Pro Gln Gly Asp Trp Leu Tyr Pro
 260 265 270
 Glu Ile Leu Leu Glu Pro Phe Leu Lys Lys Tyr Gly Ser Met Asn Tyr
 275 280 285
 Ala Ser Gly Val Val Lys Ile Ala Cys Ala Arg Gly Asn Ala Glu Leu
 290 295 300
 Tyr Ser Gly Pro Asn Asp Tyr Ser Asn Thr Val Leu Tyr Gly Gly Pro
 305 310 315 320
 Ile Met Asp Leu Glu Cys Arg Glu Asn Phe Leu Ser Thr Lys Arg Arg
 325 330 335
 Arg Asp Gly Thr Ser Trp Gly Asp Ser Phe His Thr Tyr Ser Val Gln
 340 345 350
 Trp Thr Pro Asp Phe Ile Ala Leu Ser Val Asp Gly Glu Glu Trp Ala
 355 360 365
 Arg Val Glu Ala Pro Arg Asp Ala Leu Pro Ala Val Cys Ala His Ala
 370 375 380
 Pro Arg His Leu Leu Gln Ala Gly Ser Gln Met Ala Pro Phe Asp Asp
 385 390 395 400
 His Phe Tyr Ile Thr Leu Gly Val Ala Ala Gly Gly Ile Thr Glu Phe
 405 410 415
 Arg Asp Gly Ser Ile Thr Ser Gly Gly Val Thr Lys Pro Trp Arg Asp
 420 425 430

Ser Ala Arg Lys Ala Ser Val His Phe Trp Arg His Met Ser Asp Trp
435 440 445

Phe Pro Arg Trp Ser Gln Pro Ser Leu Ile Val Asp Phe Val Lys Val
450 455 460

Ile Ala Leu
465

REVENDICATIONS

1. Protéine caractérisée en ce qu'elle comprend n totalité ou en partie la séquence SEQ ID N°1 suivante:

Arg Ile Ser Val Gln Asp Val Pro Lys Met Thr Leu Phe Ala Ph
5 Gln Gly Asn Leu.

2. Protéine caractérisée en ce qu'elle comprend n totalité ou en partie la séquence SEQ ID N°2 suivante:

Phe His Thr Tyr Ser Val Gln Trp Thr Pro Asp Phe Ile Ala L u
Ser Val Asp Gly.

10 3. Protéine selon l'une des revendications 1 ou 2 caractérisée en ce qu'elle présente un poids moléculaire de l'ordre de 50 kD.

4. Protéine selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence SEQ ID N°3, ou
15 une partie de la séquence SEQ ID N°3 suivantes,

Lys Ile Ser Tyr Ala Gln Met Pro Asp Val Lys Ile Gln Ala Phe
Arg Pro Lys Gly Leu Arg Ile Ser Val Gln Asp Val Pro Lys Met
Thr Leu Phe Ala Phe Gln Gly Asn Leu Asn His Lys Leu Asp Ser
Thr Ser Val Gly Thr Leu Ser Ala Glu Val Leu Asp Pro Val Asn
20 Gly Arg Trp Val Tyr Glu Glu Pro Asp Leu Lys Leu Lys Val Lys
Asp Val Val Tyr Tyr Asn Ala Val Phe Ser Ile Asn Lys Lys Ile
Tyr Glu Lys Thr Asn Gln Gln Phe Thr Val Thr Glu Leu Glu Asp
Pro Asn Ala Ser Thr Asp Ser Gln Lys Pro Glu Cys Lys Pro Thr
Lys Thr Arg Val Arg Gly Gly Lys Ala Cys Ala Gly Gln Thr Il
25 Phe Glu Glu Gln Phe Asp Ser Leu Asp Glu Asn Val Trp Gln Il
Glu Gln Tyr Ile Pro Ile Tyr His Pro Glu Tyr Pro Phe Val Ser
Tyr Gln Arg Asn Asn Leu Thr Val Ser Thr Ala Asp Gly Asn Leu
His Ile Asn Ala Lys Leu Gln Gln His Met Pro Gly Phe Leu Asp
Asp Ser Ile Tyr Ser Gly Thr Leu Asn Leu Phe Ser Gly Cys Thr
30 Ser Ser Ala Glu Ala Cys Ile Lys Gln Ala Ser Gly Ala Asp Ile
Leu Pro Pro Ile Val Ser Gly Arg Ile Thr Ser Ile Gly Phe Ala
Phe Thr Tyr Gly Thr Val Glu Ile Arg Ala Lys Leu Pro Gln Gly
Asp Trp Leu Tyr Pro Glu Ile Leu Leu Glu Pro Phe Leu Lys Lys
Tyr Gly Ser Met Asn Tyr Ala Ser Gly Val Val Lys Ile Ala Cys
35 Ala Arg Gly Asn Ala Glu Leu Tyr Ser Gly Pr Asn Asp Tyr Ser

Asn Thr Val Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Met Asp Leu Glu Cys Arg
 Glu Asn Phe Leu Ser Thr Lys Arg Arg Arg Asp Gly Thr Ser Trp
 Gly Asp Ser Phe His Thr Tyr Ser Val Gln Trp Thr Pro Asp Phe
 Ile Ala Leu Ser Val Asp Gly Glu Glu Trp Ala Arg Val Glu Ala
 5 Pro Arg Asp Ala Leu Pro Ala Val Cys Ala His Ala Pro Arg His
 Leu Leu Gln Ala Gly Ser Gln Met Ala Pro Phe Asp Asp His Phe
 Tyr Ile Thr Leu Gly Val Ala Ala Gly Gly Ile Thr Glu Phe Arg
 Asp Gly Ser Ile Thr Ser Gly Gly Val Thr Lys Pro Trp Arg Asp
 Ser Ala Arg Lys Ala Ser Val His Phe Trp Arg His Met Ser Asp
 10 Trp Phe Pro Arg Trp Ser Gln Pro Ser Leu Ile Val Asp Phe Val
 Lys Val Ile Ala Leu

5. Protéines selon l'une des revendications 1 à 3,
 présentant la séquence ID N°5 ou une partie de la séquence SEQ
 ID N°5 suivante:

15 Met Gly Gly Arg Val Leu Cys Leu Ile Leu Phe Ile Lys Ile S r
 Tyr Ala Gln Met Pro Asp Val Lys Ile Gln Ala Phe Arg Pro Lys
 Gly Leu Arg Ile Ser Val Gln Asp Val Pro Lys Met Thr Leu Phe
 Ala Phe Gln Gly Asn Leu Asn His Lys Leu Asp Ser Thr Ser Val
 Gly Thr Leu Ser Ala Glu Val Leu Asp Pro Val Asn Gly Arg Trp
 20 Val Tyr Glu Glu Pro Asp Leu Lys Leu Lys Val Lys Asp Val Val
 Tyr Tyr Asn Ala Val Phe Ser Ile Asn Lys Lys Ile Tyr Glu Lys
 Thr Asn Gln Gln Phe Thr Val Thr Glu Leu Glu Asp Pro Asn Ala
 Ser Thr Asp Ser Gln Lys Pro Glu Cys Lys Pro Thr Lys Thr Arg
 Val Arg Gly Gly Lys Ala Cys Ala Gly Gln Thr Ile Phe Glu Glu
 25 Gln Phe Asp Ser Leu Asp Glu Asn Val Trp Gln Ile Glu Gln Tyr
 Ile Pro Ile Tyr His Pro Glu Tyr Pro Phe Val Ser Tyr Gln Arg
 Asn Asn Leu Thr Val Ser Thr Ala Asp Gly Asn Leu His Ile Asn
 Ala Lys Leu Gln Gln His Met Pro Gly Phe Leu Asp Asp Ser Il
 Tyr Ser Gly Thr Leu Asn Leu Phe Ser Gly Cys Thr Ser Ser Ala
 30 Glu Ala Cys Ile Lys Gln Ala Ser Gly Ala Asp Ile Leu Pro Pro
 Ile Val Ser Gly Arg Ile Thr Ser Ile Gly Phe Ala Phe Thr Tyr
 Gly Thr Val Glu Ile Arg Ala Lys Leu Pro Gln Gly Asp Trp Leu
 Tyr Pro Glu Ile Leu Leu Glu Pro Phe Leu Lys Lys Tyr Gly Ser
 Met Asn Tyr Ala Ser Gly Val Val Lys Ile Ala Cys Ala Arg Gly
 35 Asn Ala Glu Leu Tyr Ser Gly Pro Asn Asp Tyr Ser Asn Thr Val

Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Met Asp Leu Glu Cys Arg Glu Asn Phe
 Leu Ser Thr Lys Arg Arg Arg Asp Gly Thr Ser Trp Gly Asp Ser
 Phe His Thr Tyr Ser Val Gln Trp Thr Pro Asp Phe Ile Ala Leu
 Ser Val Asp Gly Glu Glu Trp Ala Arg Val Glu Ala Pro Arg Asp
 5 Ala Leu Pro Ala Val Cys Ala His Ala Pro Arg His Leu Leu Gln
 Ala Gly Ser Gln Met Ala Pro Phe Asp Asp His Phe Tyr Ile Thr
 Leu Gly Val Ala Ala Gly Gly Ile Thr Glu Phe Arg Asp Gly Ser
 Ile Thr Ser Gly Gly Val Thr Lys Pro Trp Arg Asp Ser Ala Arg
 Lys Ala Ser Val His Phe Trp Arg His Met Ser Asp Trp Phe Pro
 10 Arg Trp Ser Gln Pro Ser Leu Ile Val Asp Phe Val Lys Val Ile
 Ala Leu

6. Protéine selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle présente une glycosylation en position 182.

7. Fragment d'une protéine selon l'une des revendications 1 à 6.

8. Oligonucléotide codant au moins pour la protéine ou l'un de ses fragments selon l'une des revendications 1 à 7.

9. ADN selon la revendication 8 comprenant la séquence SEQ ID N°4 suivante:

20 GAGGATCCGG GTACC ATG GGT GGA CGC GTG TTG TGT CTG ATT TTA TTT
 ATA AAA ATA TCG TAC GCT CAA ATG CCC GAT GTG AAA ATA CAA GCT
 TTT CGC CCG AAA GGA CTT CGA ATA TCC GTT CAA GAT GTC CCC AAA
 ATG ACA CTG TTC GCG TTC CAA GGC AAC TTG AAC CAT AAA CTG GAC
 AGC ACC AGC GTC GGG ACA CTG AGT GCA GAG GTA CTG GAT CCA GTC
 25 AAC GGC CGA TGG GTG TAC GAA GAG CCC GAT CTT AAA CTA AAA GTC
 AAG GAC GTC GTC TAT TAT AAC GCG GTC TTC TCA ATC AAC AAG AAA
 ATA TAC GAG AAA ACA AAC CAA CAG TTC ACC GTA ACA GAG CTA GAA
 GAT CCT AAT GCA AGC ACA GAT TCT CAG AAA CCA GAA TGT AAG CCA
 ACA AAG ACG AGA GTG CGA GGC GGC AAA GCG TGT GCC GGA CAA ACA
 30 ATA TTC GAG GAG CAA TTT GAT TCC CTG GAC GAA AAC GTT TGG CAA
 ATC GAG CAG TAT ATA CCG ATT TAT CAC CCC GAA TAC CCC TTC GTG
 TCC TAC CAG CGT AAT AAT TTA ACA GTA TCT ACC GCA GAT GGA AAC
 CTA CAT ATT AAC GCC AAA CTT CAA CAA CAT ATG CCC GGC TTT CTG
 GAC GAC TCT ATA TAT TCT GGC ACA CTT AAT TTG TTC AGT GGG TGT
 35 ACT TCG TCA GCA GAG GCA TGC ATC AAA CAG GCT TCC GGT GCT GAT

5 ATT CTA CCA CCA ATC GTC AGC GGC AGA ATC ACA TCA ATA GGA TTT
 GCA TTT ACG TAC GGA ACA GTC GAA ATC AGA GCG AAA TTA CCG CAA
 GGG GAC TGG CTG TAT CCG GAA ATT CTA TTG GAG CCG TTC TTA AAG
 AAG TAT GGA AGT ATG AAT TAT GCG TCC GGC GTA GTG AAG ATA GCG
 TGT GCG CGC GGT AAT GCA GAA CTC TAT TCC GGA CCT AAT GAC TAC
 AGC AAT ACG GTT TTG TAC GGA GGA CCG ATC ATG GAT CTG GAG TGC
 CGC GAG AAC TTT CTC TCC ACA AAA AGA CGC AGA GAC GGC ACG TCG
 TGG GGC GAC AGT TTT CAT ACA TAT TCC GTT CAA TGG ACA CCT GAT
 TTC ATA GCC CTG TCT GTG GAC GGC GAG GAG TGG GCG CGA GTG GAG
 10 GCG CCG CGG GAC GCC CTG CCG GCT GTC TGC GCG CAC GCC CCG CGG
 CAC CTG CTG CAG GCC GGC TCG CAG ATG GCG CCA TTC GAT GAC CAC
 TTC TAC ATA ACG CTA GGC GTG GCG GCA GGA GGC ATA ACG GAG TTC
 CGC GAC GGG TCT ATA ACC TCC GGG GGA GTC ACC AAG CCC TGG AGA
 GAC AGC GCT CGG AAG GCA TCC GTA CAT TTC TGG CGG CAC ATG TCC
 15 GAT TGG TTC CCA CGG TGG AGT CAG CCA TCT TTA ATC GTG GAC TTT
 GTC AAA GTT ATC GCC TTA TGATCTAGTC ATTTAGATTT TGTATAATTA
 AGTTATTAGT ATAGTTTCTG CAGGCAAAAT TAATTGCATT CTGAGTTTTT
 ATTGTCAAAC TACAATTTAA AATTTAATTC CTAAAAGATC TCTCTTCTTT
 CTAAATCTGT AATTTAGCTA ATTTTATTTG TATCATTTTC TTTTTTTAAA
 20 TTTTGATAGA GCGGCGAATG ACTAGAAGAT GTGATCTGCG AAAATAAAAC
 TAAGTGACAT GCATGCAAAG GCATACACAC AACAGAGTTT TGCATTATTA
 TTACCTTTCT TGAGCGAGAT GAGGACTACT GACGTGACCT GGAGTGATAT
 TTTGGAGCAA GCCTAAGACA GGGTCAAGTG GAGACAGCTC TAAGGCCCTT
 ATGTACCGGC GGGGTGTCTT AGGGCTGCAA TAACAACATT ACCTTTCTTA
 25 ACCAAACAGC GATATTATCT GTAATATTAT AGTTAGAAAG CCTGCATCTT
 ATACTCTTAT TGACACACGT ACCTGGATGA TTTTAACGAT GAAGAAATAA
 CATCGTGTA AAAATTTAGC TGGAAGAGAT TTTGAGGAAT CAAGAAATAC
 CCTATGAACC AGCACAGGTA CGTGTCACCA CTCTGGCTAA TTCTGCCACG
 TTGCGGTTGG TTTGAAGTTT GAGACAACCT TTGCACGATA CAATTGAGAC
 30 TAAGACCTCA TGGCTCGGAG TGAGTGGAGT CATTCAAGTT GCGACTGGCT
 CCAGTAACCA CTTATAACCA GGTAGATCGT GAGCCTATCA GCTCATTTAG
 AGCAACAAAA AACAAAATAA TGTACTCTTG AAAAAATCAT TTTAATAAAA
 GACCAGAGTG AAAAAAAAAA AAAAA

35 10. Cellule eucaryote ou procaryote exprimant une
 protéine ou l'un de ses fragments selon l'un des

revendications 1 à 7.

11. Cellule eucaryote ou procaryote portant au moins une partie d'un oligonucléotide selon l'une des revendications 8 et 9.

5 12. Cellule végétale ou bactérienne selon l'une des revendications 10 et 11.

10 13. Cellule végétale selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle est issue d'une plante appartenant aux familles de la vigne, du tabac, de la tomate ou de la pomme de terre.

14. Procédé d'obtention d'une protéine ou d'un de ses fragments selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'un oligonucléotide selon l'une des revendications 8 et 9 est exprimé dans une cellule procaryote ou eucaryote adaptée.

15 15. Médicament contenant une protéine ou l'un de ses fragments selon l'une des revendications 1 à 7 ou obtenue selon la revendication 14.

20 16. Utilisation d'une protéine ou de l'un de ses fragments selon l'une des revendications 1 à 7 pour la fabrication d'un médicament pour le traitement des affections liées au complexe lipopolysaccharidique.

17. Utilisation selon la revendication 16 pour traiter le choc septique.

25 18. Procédé d'élimination du complexe lipopolysaccharidique de préparations contenant celui-ci, ledit procédé consistant à lier le complexe lipopolysaccharidique à une protéine ou à l'un de ses fragments selon l'une des revendications 1 à 7.

30 19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que la protéine liant le complexe lipopolysaccharidique est fixée sur un support.

20. Utilisation de fragments d'un des oligonucléotides selon la revendication 8 pour l'amplification génique.

FIG 1B

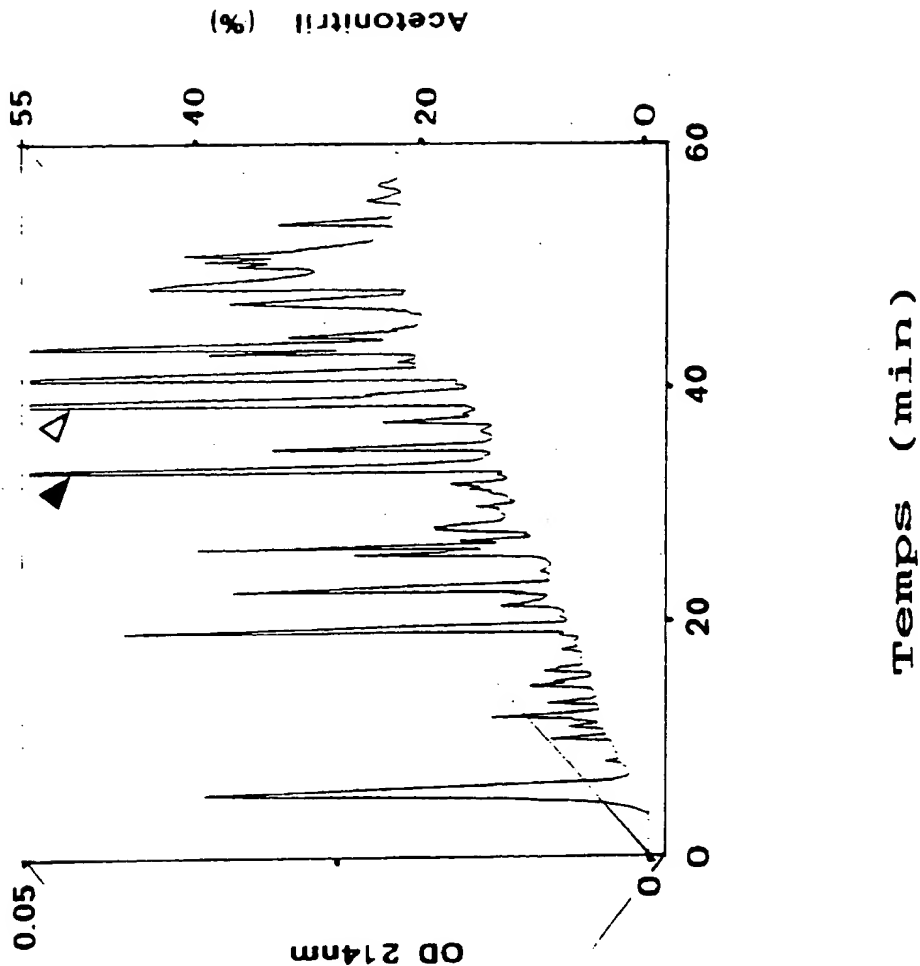
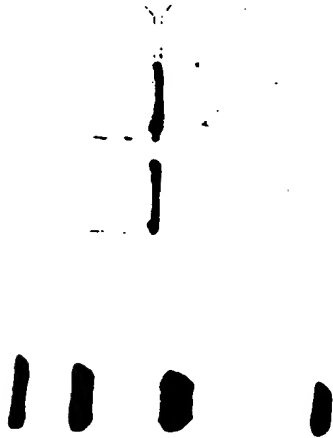


FIG 1A

1 2 3 4



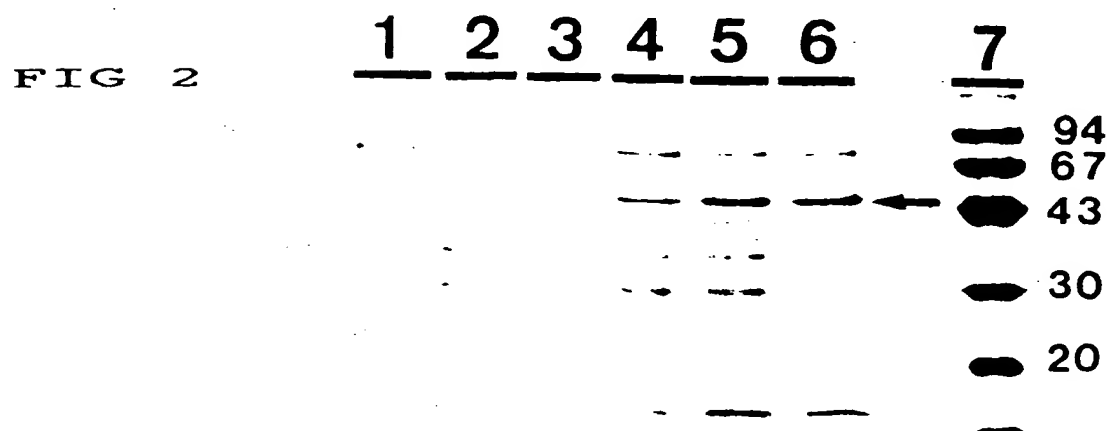


FIG 3A

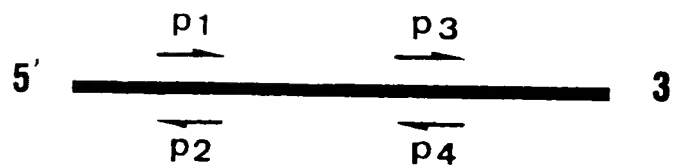


FIG 3B



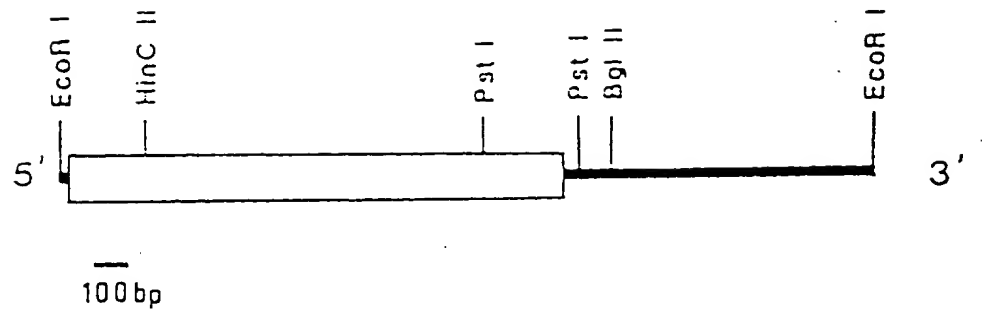


FIG 4

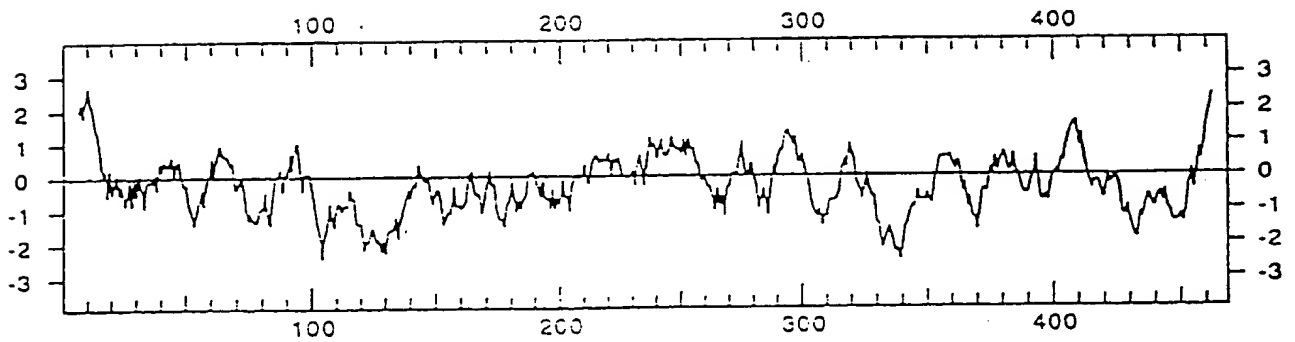


FIG 5

P 50	243	SGRI	T	SIGFA	FTYGT	VEIRAKLP	QCDW	LYP	EILL	EP	FLKKY	SGMNY	ASGVV	293		
Bci	503	SGKI	N	IKDKL	SL	KYGRVD	FRAKLP	ITGDG	VWPA	LWML	LP	KDSVY	G	TWA	ASGEI	553
P 50	294	KIAC	ARGNAEL	YSGP	NDY	SN	TVLY	CGP	IMDL	ECRE	ENFI	SPKR	RRDGT	SWGDS	345	
Bci	554	DVME	ARGRL	PGSV	SGT	I	H	FGG	QWPVN	QSSG	GDY	I	FPE	GGT	FAND	597
P 50	346	FHTY	SVQW	TPDF	I	AL	SV	VDG	364							
Bci	598	YHMYSVM	WEED	N	IKWY	VDG	616									
Fsu	121	FHTY	GLEW	TPNY	V	RW	VDG	139								
Cth	175	FHTY	GF	EW	RP	DY	IDFY	VDG	193							
Bsu	172	YHTY	AF	DW	Q	PN	SI	IKWY	VDG	190						
Bam	169	YHTY	AF	DW	Q	PN	SI	IKWY	VDG	189						
Bma	167	FHTY	AF	DW	Q	PGY	IKWY	VDG	187							
Bl.i	173	YHTY	AF	DW	Q	PN	SI	IKWY	VDG	191						

FIC

FIG 6

FIG 7

P 50	39	RISVQDV	PKMTL	FAFQGNL
LBP	86	RVQGRWK	VRKSEFF	KLOGSF
BPI	86	KISGKWK	AQKREFL	KMSGNF

FIG 8

1	2
—	—
→ —	
	—106
	—80
	—49.5
	—32.5
	—27.5

FIG 9A

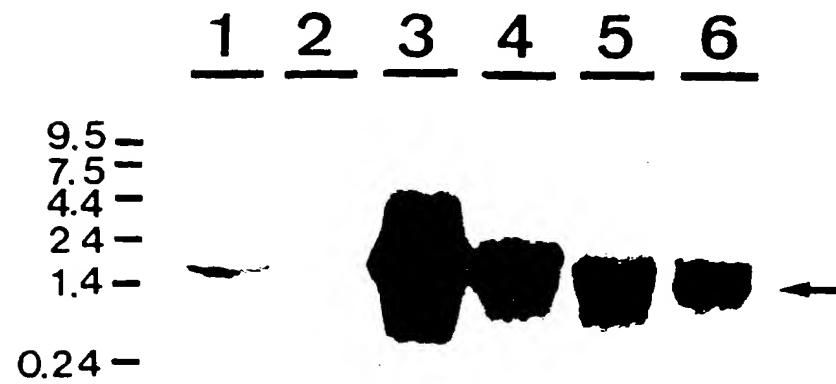
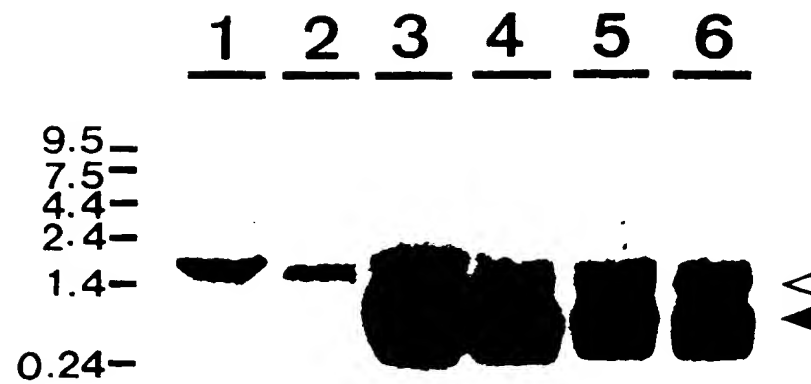


FIG 9B



INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFA 503723
FR 9407083

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. (MICROFILMS), vol.261, no.16, 5 Juin 1986, BALTIMORE, MD US pages 7357 - 7365 JUN AKETAGAWA ET AL. 'Primary structure of Limulus anticoagulant anti-lipoplysaccharide factor' * abrégé * * page 7357, colonne de droite, alinéa 2; figure 1 *	1,2,4,5, 7,16,18
D,A	JOURNAL OF BIOCHEMISTRY., vol.101, no.6, Juin 1987, TOKYO JP pages 1321 - 1330 TATSUSHI MUTA ET AL. 'Primary structure of anti-lipoplysaccharide factor from american horseshoe crab, Limulus polyphemus' * abrégé * * page 1323, colonne de gauche, alinéa 5; figure 1 *	1,2,4,5, 7
A	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol.217, no.2, Mars 1994, NEW YORK US pages 231 - 235 WON-JAE LEE ET AL. 'Isolation and identification of cecropin antibacterial peptides from the extracellular matrix of the insect integument' * page 231, colonne de gauche, alinéa 1; figure 4 *	1,2,7
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07K C12N A61K C12Q
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
6 Février 1995		Montero Lopez, B
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire I : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

2

EPO FORM 1503 (01.82) (P04C13)

THIS PAGE BLANK (USPTO)